Induktion von Chromosomenveränderungen durch Poliomyelitisvirus

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hartmut D. Bartsch
aus
Neumarkt/Schlesien

1970

Induktion von Chromosomenveränderungen durch Poliomyelitisvirus

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Hartmut D. Bartsch

aus

Neumarkt/Schlesien

Berichter: Prof. Dr. Lüers

" " Kümmel

ag der mündl. Prüfung: 27. JAN. 1970

g der Promotion: 25. MAI 1970

Aus dem Institut für Genetik der Freien Universität Berlin
(Dir. Prof. Dr. Lüers)
und dem
"Viruslaboratorium im Städtischen Wenkebach-Krankenhaus"
(Leiter: Priv.-Doz.Dr. Habermehl, Priv.-Doz.Dr. Diefenthal)

Induktion von Chromosomenveränderungen durch Poliomyelitisvirus

von

Hartmut D. Bartsch

Teil I

Dissertation der Freien Universität Berlin

Berlin 1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsübersicht

Seite

Einleitung 1

Teil I

Chromosomenveränderungen in Poliomyelitisvirus-infizierten Gewebekulturzellen. Beziehungen zwischen Ausmaß der Schädigung und Ablauf des Virusreproduktionszyklus 4

I. Material und Methodik 4

A. Gewebekultur und verwendete Zellstämme 4

1. Diploide menschliche Zellstämme 4
2. Aneuploide menschliche Zellen 5
3. Mäusefibroblasten 6

B. Chromosomendarstellung und Färbungen 7

1. Chromosomendarstellung 7
2. Färbungen 8
   a) Hydrolyse und Desinfektion 8
   b) GIEMSA-Färbung 9
   c) Orceinfärbungen 9
   d) FEULGEN'sche Nuklealreaktion 10
   e) Fastgreen-Färbung 11
3. Mikroskopie und Mikrophotographie 12

C. Virushaltung und Virusreinigung 13

1. Virushaltung 13
2. Virustiter 13
3. Virusreinigung 14

D. Versuchsaufbau 15

Seite

II. Auftreten von Chromatidbrüchen, diffusen Chromosomenveränderungen und c-anaphase-ähnlichen Chromosomen bei vollständigem Ablauf des Poliomyelitisvirus-Reproduktionszyklus 18

A. Beschreibung der drei Grundformen chromosomaler Veränderungen nach 6-stündiger Poliomyelitisvirus-Infektion in vitro 18

1. Diploide Gewebestämme 18

a) Auswertung gut ausgebreiteter Metaphaseplatten 18

b) Verschlechterung der Metaphaseplattenqualität 19

c) Auswertung aller Metaphaseplatten, unabhängig von ihrer Qualität 20

d) Beschreibung der drei verschiedenen Arten von Poliomyelitisvirus-induzierten Chromosomenveränderungen 21

a) C-anaphase-ähnliche Chromosomenmodifikationen (CA) 21

b) Schwere diffuse Chromosomenveränderungen (6D) 22

c) Chromatidbrüche (B) 23

2. Aneuploide Gewebekulturzellen 25

B. Zeitliches Auftreten von c-anaphase-ähnlichen Chromosomen, diffusen Chromosomenveränderungen und Chromatidbrüchen 26

C. Kontrolluntersuchungen mit hochgereinigtem Poliomyelitisvirus 28

III. Ausbleiben der schweren diffusen Chromosomenveränderungen nach Hemmung des Infektionsablaufes durch Guanidin

A. Beschreibung der chromosomalen Veränderung im Polioguanidinsystem 28

B. Colchizin-ähnliche Wirkung von Guanidin 31

C. Häufigkeitszunahme spontaner Endoreduplikationen nach Guanidinapplikation 33

IV. Ausbleiben der Chromosomenveränderungen nach Inokulation poliounempfänglicher Zellen 35

V. Zwischenergebnis 37

Seite

T e i l II

Beziehungen zwischen Chromosomenveränderungen, Poliomyelitisvirus-Reproduktion und lysosomalen Enzymen 38

I. Einführung 38

II. Material und Methodik 38

A. Versuchsaufbau 38

B. Lysosomale Testenzyme 41

1. Saure DNase 41

2. Saure Phosphatase 44

C. Erfassung der freien und der partikelgebundenen lysosomalen Aktivität 45

1. Freie lysosomale Aktivität 45

2. Lysosomale Gesamtaktivität 46

III. Zunahme der freien lysosomalen Aktivität bei vollständigem Ablauf des Poliomyelitisvirus-Reproduktionszyklus 48

A. Vergleich der lysosomalen sauren DNase nach Polioinfektion mit der freien und der Gesamtaktivität 48

B. Zeitlicher Verlauf der polioinduzierten Freisetzung lysosomaler Enzyme 49

IV. Fehlen freier lysosomaler Aktivität nach Hemmung des Poliomyelitisvirus-Reproduktionszyklus durch Guanidin 51

V. Ergebnisse 52

Seite

T e i l III

Der Einfluß von Enzymen auf die Struktur der Metaphasechromosomen 53

I. Einführung 53

II. Material und Methodik 54

A. Untersuchte Enzyme 54

1. Trypsin 54
2. Papain 54
3. Pronase 55
4. Collagenase 55
5. Neutrale DNase 55
6. Saure DNase 55
7. Saure Phosphatase 56
8. Muramidase (Lysozym) 56
9. Neutrale RNase 56

B. Einwirkungsdauer und Inkubationstemperatur 56

C. Isolierung von Metaphasechromosomen 57

III. Strukturveränderungen der Chromosomen durch proteopytische Enzyme 60

A. Trypsin 60
B. Papain 62
C. Pronase 62
D. Collagenase 64

IV. Wirkung von DNase auf Metaphasechromosomen 64

V. Einwirkung von RNase auf Metaphasechromosomen 67

VI. Einwirkung von saurer Phosphatase oder Muramidase auf Metaphasechromosomen 67

VII. Wirkung der freien lysosomalen Enzyme auf Metaphasechromosomen 68

Seite

D I S K U S S I O N

I. Einführung 77

II. C-anaphase-ähnliche Chromosomenmodifikationen (CA) 78

A. Allgemeines 78

B. Zeitpunkt des Auftretens, Eindeutigkeit und Signifikanz 79

C. Auftreten von CA bei anderen Virusinfektionen 79

D. Auftreten von CA im Verlauf pathologischer Mitosen 79

E. Auftreten von CA bei Endomitosen 80

F. Allozyklie 81

G. Molekularbiologische Erklärungsmöglichkeiten 82

1. Spindeleffekte 83

2. Veränderungen des Ionengleichgewichtes der Zelle 84

III. Die schweren diffusen Chromosomenveränderungen (6D) 86

A. Begriffsbestimmung 86

B. Zeitpunkt des Auftretens, Eindeutigkeit und Signifikanz 86

C. Auftreten diffuser Chromosomenveränderungen bei anderen Virusinfektionen 87

D. Auftreten diffuser Chromosomenveränderungen nach Infektionen mit Protozoen, Rickettsien und Mycoplasmen 90

E. Diffuse Chromosomenveränderungen nach Einwirkung von Chemikalien 91

F. Diffuse Chromosomenveränderungen und Allozyklie 93

G. Diffuse Chromosomenveränderungen im Laufe der Meiose 93

H. Diffuse Chromosomenveränderungen im Laufe pathologischer Prozesse 94

I. Polioinduzierte, schwere diffuse Chromosomenveränderungen und Proteclyse 95

J. Das lysosomale Konzept 97

Seite

IV. Chromatidbrüche (B) 99

A. Auftreten und Signifikanz 99

B. Unterscheidung zwischen echten Brüchen und gaps 99

C. "Pseudofragmentation" (Wolf, 1963) 102

D. Molekularbiologische Erklärungen für die polioinduzierten Chromatidbrüche (B) 104

Zusammenfassung 106

Abkürzungen 109

Tabellen 110

Literaturverzeichnis 120

Band II: Abbildungen

EINLEITUNG

Die vorliegenden Untersuchungen behandeln den Zusammenhang zwischen verschiedenen Phasen des Poliomyelitisvirus-Reproduktionszyklus und der Zunahme von Chromosomenschäden sowie von lysosomalen Enzymen in den infizierten Zellen.

Wir unterscheiden vier Möglichkeiten der Wirt-Virusbeziehung:
die unvollständige Reproduktion (1), die maligne Transformation (2), die komplette Reproduktion ohne (3) oder mit (4) cytopathischem Effekt. Im Falle eines cytopathischen Effektes können die folgenden Veränderungen der Zellmorphologie auftreten und im Lichtmikroskop dargestellt werden:

a) Abrundung der Zellen,
b) Bildung von Riesenzellen,
c) Auftreten von Einschlußkörpern in Cytoplasma oder Kern,
d) Veränderungen der Zelloberfläche,
e) Margination und Verklumpen des Chromatins,
f) Pyknose,
g) völliger Zellverfall.

Außer den relativ undifferenzierten Ruhekernveränderungen sind auch Schäden an den Chromosomen virusinfizierter Zellen beschrieben worden. Die ersten strukturellen Chromosomenveränderungen wurden von HAMPAR et al. (1961) für das Herpes simplex Virus beschrieben. Heute existieren bereits über 100 Publikationen (im Literaturverzeichnis durch + gekennzeichnet) auf dem Gebiet der virusinduzierten strukturellen Chromosomenaberrationen (vgl. die Bibliographie von MICHAILOVA, 1966). Darüber hinaus sind numerische Chromosomenaberrationen nach Virusinfektionen bekannt.

Probleme der Carcinogenese (IRLIN, 1965, NICHOLS, 1966), Fragen klinisch bedeutsamer Infektionskrankheiten (NICHOLS, 1962, AULA, 1963, BOUé et al., 1964, HARNDEN, 1964, ZUR HAUSEN et al., 1965, MATSANIOITIS et al., 1966) und die Grundlagenforschung in Virologie und Cytologie (STICH et al., 1964, YERGANIAN et al., 1965, HABERMEHL et al., 1966) sind eng verknüpft mit der Erforschung struktureller, virusinduzierter Chromosomenveränderungen. Folgende Entstehungsmöglichkeiten werden heute diskutiert:

1. vermehrte Freisetzung lysosomaler Enzyme (ALLISON, 1967),
2. Hemmung der Syntheseabläufe der Wirtszelle (NICHOLS et al., 1965),
3. Einlagerung von Virusgenom in das Wirtszellgenom (ZUR HAUSEN, 1967, DOERFLER, 1968, NICHOLS et al., 1968).

Das in dieser Arbeit verwendete Wirtvirussystem gestattet eine Untersuchung dieser Ursächlichkeiten. Wir arbeiteten mit dem Poliomyelitisvirus, Typ 1, Stamm Mahoney. Dieses RNS-Virus repliziert im Cytoplasma der infizierten Zelle. Der vollständige Reproduktionszyklus ist durch die Bildung reifen Virus und den Zellzerfall gekennzeichnet.

Ein kompletter Reproduktionszyklus wird in fünf Phasen unterteilt. Nach der elektrostatischen Adsorption (1) des Viruspartikels an die Zelloberfläche erfolgt vermutlich enzymatisch die Penetration (2) der Virusnukleinsäure in das Zellinnere. Es kommt zur Freilegung der Virusnukleinsäure (uncoating), zum Eintritt in die Latenzphase (3). Schließlich werden reife, infektionsfähige Viruspartikel gebildet (Maturation (4)), die aus der Zelle freigesetzt werden (Liberation (5)).

Im Falle des Poliomyelitisvirus treten schon wenige Minuten nach Infektion die ersten viruscodierten Abschaltvorgänge auf, in deren Verlauf es zur Hemmung der zelleigenen Protein-, RNS- und DNS-Synthese kommt. Die replikative Form der Virus-RNS und die Polio-RNS-Polymerase können etwa ab

der dritten Stunde nach Infektion nachgewiesen werden. Die Virusfreisetzung zieht sich von der dritten Stunde bis zum völligen Zellzerfall (nach 6-7 h.p.inf. beginnend) hin. DIEFENTHAL et al. (1962) beschreiben den charakteristischen cytopathischen Effekt des Poliomyelitisvirus folgendermaßen: "... (1.) periphere Retraktion des Cytoplasmas und Abrundung der Zellen, (2.) Bildung großer perinukleär gelegener Verdichtungen, (3.) Verschwinden des Nukleolus, (4.) Margination des Chromatins, (5.) Pyknose und völliger Zerfall der Zellkerne". Neben den cytopathischen Veränderungen besteht eine Stimulierung bestimmter Zellfunktionen, z.B. ein Ansteigen des Mitoseindex (HABERMEHL et al., 1966).

Es muß bereits an dieser Stelle betont werden, daß die "morphologischen Reaktionsmöglichkeiten einer Zelle beschränkt sind" (DIEFENTHAL et al., 1962). So darf nicht allein aus einem bestimmten pathologischen Befund der Zellmorphologie oder der Chromosomen auf die Ursache geschlossen werden. Riesenzellen können beispielsweise durch physikalische, chemische oder biologische Noxen induziert werden. Ebenso unterscheiden sich Chromatidbrüche, die spontan in einer Normalzellkultur entstanden, nicht von solchen, die durch alkylierende Substanzen oder durch Virusinfektion verursacht wurden.

Folgende Fragen konnten in dem verwendeten Wirtvirussystem untersucht werden:

1. Treten in polioinfizierten Gewebekulturzellen Chromosomenveränderungen auf?
2. Gibt es verschiedene Arten von Chromosomenveränderungen?
3. Besteht eine Beziehung zwischen der Häufigkeit der Chromosomenveränderungen und dem zeitlichen Ablauf der Infektion?
4. Lassen sich einzelnen Veränderungstypen unterschiedliche Phasen der Virusproduktion zuordnen?
5. Welche Entstehungsmöglichkeiten können für die Chromosomenveränderungen wahrscheinlich gemacht bzw. nachgewiesen werden?

T e i l I

Chromosomenveränderungen in Poliomyelitisvirus-infizierten Gewebekulturzellen. Beziehungen zwischen Ausmaß der Schädigung und Ablauf des Virusreproduktionszyklus

I. Material und Methodik

IA. Gewebekultur und verwendete Zellstämme

IA1. Diploide menschliche Zellstämme

Von einem Abort wurden nach der Methode von HAYFLICK und MOORHEAD (1961) Primärkulturen (Monolayer) des Intestinums in Vierkantflaschen (200 ccm, 12 ml Nährmedium) angezüchtet. Nur voll ausgewachsene Flaschen wurden zur Zellpassage herangezogen. Es wurde zweimal wöchentlich passagiert (Einzelheiten s.u.), wobei aus einer Vierkantflasche zwei neue Flaschen angesetzt wurden. Als Nährmedium wurde EAGLE MEM mit 10 % inaktiviertem Kälberserum verwendet. Das 'minimum essential medium' nach EAGLE (1959) wurde in Pulverform von der Fa. General Biochemicals bezogen, in quarzdestilliertem aq.tridest. gelöst und mit Natriumbicarbonat auf pH 7.2 eingestellt. Für die Gewebezucht wurde das Medium mit 10 % inaktiviertem Kälberserum versetzt und enthielt die folgenden Antibiotica: 50 E/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin sowie 25 I.E. Mycostatin. Das Kulturmedium wurde mittels Filtration durch MILLIPORE-Filter sterilisiert.
Die Zellen der 14. Subkultur waren in FALCON-Schalen angezüchtet worden und wurden für die Chromosomenspreitung verwendet (Abb.1). Der Mitoseindex (c-Metaphasen) dieser Subkultur betrug nach 3stündiger Applikation von 0.05µg/ml Colchizin 12 $\pm$ 30 % (n = 2000). Die Analyse von 100 c-Metaphasen ergab, daß es sich um einen Zellstamm vom Karyotyp 46,XX handelte. 3 % aller Metaphasen (n = 1000) waren polyploid.

Als weiterer diploider Zellstamm wurden WI-38 (vgl. TRLIFAJOVA et al., 1966) Zellen verwendet. Hierbei handelt es sich um diploide Fibroblasten (Karyotyp 46,XX), die aus einer menschlichen embryonalen Lunge isoliert worden sind. Die Kultivierung erfolgte in 200 ccm Vierkantflaschen, die jeweils 12 ml EAGLE MEM erhielten. Zur Passage wurden zweimal wöchentlich aus einer vollausgewachsenen Vierkantflasche zwei neue Flaschen angesetzt. Die Zellen der 14. Passage wurden in FALCON-Schalen angezüchtet und für die Chromosomenspreitung (Abb.2) aufgearbeitet.
Es lag bereits eine fortgeschrittene Polyploidisierung vor (25/100 polyploide Metaphasen) und der Mitoseindex war sehr niedrig (4%. nach 3-stündiger Einwirkung von 0.05 µg/ml Colchizin; n = 3000).

IA2. Aneuploide menschliche Zellen

Die Mehrzahl der Versuche wurde mit HEp-2 (= human epithelial) Zellen durchgeführt. Dieser Stamm war für die Untersuchungen besonders geeignet, da er permanent züchtbar ist und einen hohen Mitoseindex aufweist (129%. $\pm$ 1 % c-Metaphasen nach 2-stündiger Einwirkung von 0.05 µg/ml Colchizin bei 15000 ausgewerteten Zellen). Die HEp-2 Zellen sind aneuploide Zellen, die 1953 von NORRYD und FJELDE aus einem Larynxcarcinom isoliert wurden. Nach etwa 300 Passagen im hiesigen Labor betrug die mittlere Chromosomenzahl 71 $\pm$ 0.1 bezogen auf 228 analysierte c-Metaphasen (Abb.3 + 4). Das verwendete Kulturmedium war EAGLE MEM mit 10 % inaktiviertem Kälberserum (vgl. DE BESTE et al., 1966).

Die Gewebekultur wurde in ROUX-Flaschen (1200 ccm, 80 ml Medium) durchgeführt. Nur Flaschen mit vollausgewachsenen Monolayern (5 x 10^7 Zellen/ROUX-Flasche) wurden für die Passage verwendet. Die Zellen wurden jeweils zweimal wöchentlich passagiert, wobei aus einer ROUX-Flasche drei neue Flaschen angesetzt wurden. Vor der Durchführung der Passage

wurde das Anzuchtmedium abgesaugt und durch 20 ml einer Trypsin-Versen-Lösung (1 g/l Trypsin, 2,5 % n/10 Versen in PBS)* ersetzt. Nach 3 bis 5-minütiger Einwirkungszeit wurden die Zellen durch leichtes Schütteln von der Glasfläche abgelöst und zur Unterbrechung der Trypsin-Versen-Wirkung in eine Vorlage von (etwa 1 ml) eisgekühltem Kälberserum überführt. Nun wurde die Suspension etwa 5 min bei 500 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment in frischem vorgewärmten Nährmedium mit 10 % inaktiviertem Kälberserum (80 ml Medium je ROUX-Flasche) resuspendiert.

Zur Herstellung von Chromosomenpräparaten wurde die Zellsuspension in FALCON-Schalen pipettiert und zwei Tage bei 37° C in der Begasungsanlage von DIEFENTHAL et al. (1962 b) bei 5 % CO_2 in Luft und 95 % Luftfeuchtigkeit angezüchtet.

*Isotone Salzlösung pH 7.2 = PBS ('phosphate buffered salt solution' nach DULBECCO et al., 1954).
0.2 g KCl, + 1.15 g $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$, + 0.2 g KH_2PO_4, + 0.1 g $MgCl_2$, + 0.1 g $CaCl_2$, + 8.0 g NaCl.

IA3. Mäusefibroblasten

Geburtsreife Mäuseembryonen des AGNES-BLUHM-Stammes wurden steril aus dem Uterus entnommen, eventriert und mit einer Schere in Stücke von 2-4 mm Kantenlänge zerkleinert (DIEFENTHAL et al., 1961). Entsprechend der Methode von DULBECCO et al. (1954) wurden die Gewebestückchen gründlich in PBS gewaschen und bei 37° C auf dem Magnetrührer mit 2 g/l "Trypsin,1 : 300" inkubiert. Die herausgelösten Einzelzellen und kleineren Zellkomplexe wurden 5 min lang bei 500 x g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment in vorgewärmtem Nährmedium (EAGLE MEM) mit 15 % inaktiviertem Kälberserum resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen durch eine zweifache Mullage filtriert und in ROUX-Flaschen (1200 ccm) mit je 80 ml Kulturflüssigkeit angezüchtet.

Am 2. Tag wurde das Nährmedium gewechselt und am 4. Tag waren die Zellen zu einem Monolayer ausgewachsen.
Zur Passage (s.o.) wurden die Zellen trypsiniert, zentrifugiert, in frischem Nährmedium resuspendiert und mit einer automatischen Pipette in Petrischalen (je 6 ml) abgefüllt. Nach 2-tägiger Inkubation in der Begasungsanlage von DIEFENTHAL et al. (1962 b) bei 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO_2 in Luft wurden die Kulturen für die Versuche verwendet. Die Zellzahl in den Petrischalen (5 cm Ø) betrug nach der 1. Passage im Mittel 3 x 10^6 Zellen/Schale.

Die Zellen waren zu 95 % diploid (Abb.5).

IB. Chromosomendarstellung und Färbungen

IB1. Chromosomendarstellung

Um die Chromosomen besser analysieren und leichter identifizieren zu können, wurden sie in der c-Metaphase (LEVAN, 1938) dargestellt. Die Mitose wurde durch 2-stündige Applikation von 0.05 µg/ml Colchizin (N-desacetyl-N-methyl-colchizin) arretiert. Anschließend erfolgte die Aufarbeitung der Zellen entsprechend der MOORHEAD-Methode (1960) nach dem folgenden Schema (die angegebenen Volumina beziehen sich auf jeweils 1 FALCON-Schale):

a) Trypsinieren der Zellen (3 min 5 ml 0.1 % Trypsin + 2.5 % Versen in isotonem PBS bei 37° C)

b) Überführen der Zellsuspension in eine Vorlage von 0.5 ml eiskaltem Kälberserum, um die Wirkung des Trypsin-Versen-Gemisches zu unterbrechen

c) Zellsuspension 5 min bei 800 x g zentrifugieren, Überstand verwerfen

d) Zellsediment in 30 ml vorgewärmter hypotoner Lösung

(aq.dest. + EAGLE MEM, 5 + 1) resuspendieren und 20 min im Wasserbad bei 37° C inkubieren

e) Zellsuspension 5 min bei 800 x g zentrifugieren, Überstand verwerfen

f) Zellsediment in 10 ml Fixierlösung resuspendieren (frischangesetztes, eiskaltes Gemisch von Methanol + Eisessig, 3 + 1) und etwa 30 min in der Kälte einwirken lassen

g) Zellsuspension 5 min bei 800 x g zentrifugieren, Überstand verwerfen

h) Zellsediment in 0.5 ml frischer Fixierlösung resuspendieren; das Volumen ist so gewählt, daß sich eine geeignet dichte Zellsuspension (4 x 10^6 Zellen/ml) ergibt

i) Auftropfen der Suspension auf gut entfettete (!), mit aq.dest. benetzte, kalte Objektträger, Abschütteln überschüssiger Flüssigkeit

j) Lufttrockenmethode (nach ROTHFELS und SIMINOVITCH, 1957)

k) Färbung (mit oder ohne vorangegangener Hydrolyse)

IB2. Färbungen

a) Hydrolyse und Desinfektion

Bei der GIEMSA-Färbung und der FEULGEN'schen Nucleal-Reaktion wurden die Präparate vor der Färbung 6-7 min in 1 n HCl bei 60° C hydrolysiert. In Versuchen mit Poliomyelitisvirus wurden vor der Färbung sowohl infizierte als auch nicht infizierte Präparate (Serie K und P) 10 min in 3.5 % wässrigen Formaldehyd inkubiert, um das Poliovirus zu inaktivieren. Dementsprechend ergab sich für den Zeitabschnitt zwischen der Chromosomentrocknung und der Färbung folgendes Schema:

1. Hydrolyse (6-7 min in 1n HCl bei 60° C)
2. 10 sec kalte 1n HCl
3. 10 sec aq.dest.
4. 10 min 3.5 % Formaldehyd
5. 20 sec. PBS, um Isotonie mit der Farblösung und ein neutrales pH zu erzielen
6. Färbung

b) GIEMSA-Färbung

Vor der GIEMSA-Färbung wurden die luftgetrockneten Chromosomenpräparate hydrolysiert. Die frischangesetzte, doppeltfiltrierte (!) Farblösung enthielt 25-30 % GIEMSA-Stammlösung in SÖRENSEN-Puffer (pH 6.9) oder WEISE's Puffer (pH 7.4). Die Färbezeit betrug 15-20 min. Zur Entwässerung wurden die Präparate rasch durch die aufsteigende Alkoholreihe geführt (50 %, 70 %, 90 % absoluter Alkohol). Nach zweimaligem Auswaschen (je 5 min) des Alkohols durch Xylol wurde in Entellan eingebettet. Die GIEMSA-Färbung eignet sich nicht für die Phasenkontrastbeobachtung nach ZERNIKE, da die Wellenlänge der Farbe nach einer $\lambda/4$ Verschiebung zu keinem guten Kontrast führt.

WEISE's Puffer (pH 7.4): 11,4 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ + 2.5 g KH_2PO_4 + 5000 ml aq.bidest.

c) Orceinfärbungen

Orcein ist kein selektiver DNS-Farbstoff. Es färbt Chromosomen und Cytoplasma. Wegen ihrer großen Dichte werden die Chromosomen am stärksten angefärbt. Es wurden zwei verschiedene Farblösungen aus Orcein hergestellt: 1. Orcein-Essigsäure (2 % Orcein in 65 % Essigsäure, Färbezeit etwa 2 Std, Entwässern der Präparate in der aufsteigenden Alkoholreihe: 70 %, 95 % und absoluter Alkohol, Einbetten in Euparal) und 2. Orcein-Essigsäure-Milchsäure (1 % Orcein

in Eisessig + Milchsäure, 1 + 1, Färbezeit etwa 6 Std, aufsteigende Alkoholreihe und Einbettung wie oben).
Die Färbungen wurden ohne Hydrolyse durchgeführt. Die mit Orcein gefärbten Chromosomen eigneten sich besonders für die Auswertung im Phasenkontrastmikroskop.

d) FEULGEN'sche Nuklealreaktion

Durch die FEULGEN-Färbung kann man die DNS der Chromosomen selektiv anfärben. Da im Gegensatz zu vielen pflanzlichen Objekten die FEULGEN-Färbung bei menschlichen Chromosomen nur zu einer schwachen Objektanfärbung führt, wurden diese Präparate im Phasenkontrastverfahren untersucht.

Färbeschema:

1. Hydrolyse
2. 2 Std SCHIFF'sches Reagens
3. 3 x 3 min waschen in SO_2-wasser
4. 15 min waschen in fließendem Leitungswasser
5. 5 sec spülen in aq.dest.
6. Entwässern der Präparate in der aufsteigenden Alkoholreihe (50 %, 70 %, 90 %, absoluter Alkohol)
7. Auswaschen des Alkohols durch Xylol (2 x je 5 min)
8. Einbetten in Entellan

SCHIFF'sches Reagens

3.0g Pararosanilin + 60 ml 1n HCl mit 300 ml kochendem aq.dest. übergießen, auf 60° C abkühlen lassen, durch Whatman Papier Nr.2 filtrieren, dem Filtrat 6.0g Natriumpyrosulfit und 30 ml 1n HCl zugeben, Glas fest verschließen und 1 min lang kräftig schütteln, etwa 12 Std bei 18° C im Dunkeln stehen lassen.
Etwa 450 mg geglühte Tierkohle zugeben, 1 min kräftig schütteln und durch Whatman Papier Nr.2 filtrieren.

Das Filtrat muß wasserklar sein, höchstens gelblich, auf keinen Fall rosa. Bei 4° C gut verschlossen im Dunkeln aufbewahren.

SO_2-Wasser

3.0g Natriumpyrosulfit + 30 ml 1n HCl ad 600 ml Leitungswasser, für jede Färbung frisch ansetzen.

e) Fastgreen-Färbung

Die Fastgreenfärbung nach ALFERT und GESCHWIND (1953) färbt chromosomale Histone und Protamine. Fixiert man, wie ALFERT und GESCHWIND vorschlagen, in Formaldehyd, so erhält man nach dem Ausbreiten und Lufttrocknen vollständig deformierte Chromosomen; fixiert man andererseits in Alkohol-Eisessig, so kommt es zu einer Verschiebung des isoelektrischen Punktes der chromosomalen Proteine und einer ungenügenden Aufnahme des basischen Farbstoffes (SCHWANTES, 1952). Nach neueren Untersuchungen geht ein Teil der Histone durch Lösung in Alkoholeisessig verloren (Dick et al., 1968). Wir haben versucht, diese Schwierigkeit zu umgehen, indem wir durch Alkohol-Eisessig fixierte und luftgetrocknete Präparate 6 Std in Formaldehyd nachbehandelten. Dennoch waren die Präparate meist nur schwach gefärbt. Im einzelnen wurde nach folgendem Arbeitsschema verfahren:

α. Luftgetrocknete Chromosomenpräparate werden 6 Std in einer 10 % wässrigen Lösung von neutralem Formaldehyd (Einstellen mit Natronlauge) nachfixiert. Das Formol wird anschließend in fließendem Leitungswasser 12 Std lang ausgewaschen.

β. Die Nukleinsäuren werden durch 15 min Inkubation in 5 % Trichloressigsäure im kochendem Wasserbad entfernt, weil nach KAUFMANN et al. (1951) die Nukleinsäuren bei der Färbung kompetitiv mit den

Proteinen interferieren können. Anschließend wird die TCA durch 70 % Alkohol (3 x 10 min) ausgewaschen, und die Präparate werden in aq.dest. gespült.

γ. Die Präparate werden 30 min lang bei Zimmertemperatur in einer 0.5 % wässrigen Lösung von Fastgreen FCF gefärbt. Die Farblösung wird vorher durch ein möglichst geringes Volumen Natronlauge auf pH 8.0 - 8.1 eingestellt.

δ. Die Präparate werden in 95 %igem, anschließend in absolutem Alkohol entwässert, und der Alkohol wird durch Xylol (2 x 5 min) ausgewaschen.

ε. Einbetten der Präparate in Entellan.

IB3. Mikroskopie und Mikrophotographie

Die Routineuntersuchung erfolgte am LEITZ-Mikroskop DIALUX im Hellfeld unter Verwendung eines Grünfilters. Es wurde meist ein 10 x vergrößerndes Okular und ein Ölimmersionsobjektiv 100 x mit der numerischen Apertur 1.30 verwendet. Bei Unklarheiten oder bei Versuchen von grundlegender Bedeutung wurden die Untersuchungen am WL-Mikroskop der Fa. ZEISS vorgenommen, wobei das Phasenkontrastbeleuchtungsverfahren nach ZERNIKE in Anwendung kam. Das Okular (Periplan) hatte eine Vergrößerung von 8 x, die Zwischenvergrösserungen des OPTOVAR waren 1.0 x, 1.25 x, 1.6 x und 2.0 x. Da die numerische Apertur des 100 x Phasenkontrastobjektivs (Ölimmersion, Neofluar) n.A. = 1.32 betrug, wurde in der Regel der OPTOVAR mit der Vergrößerungsstufe 1.25 x oder 1.6 x angewendet. Es wurde ein Interferenzgrünfilter verwendet.

Die photographischen Aufnahmen wurden an beiden Mikroskopen durchgeführt (entweder LEICA M 4 oder Photoaufsatzkamera I der Fa. ZEISS kombiniert mit dem vierstufigen Lichtmeßgerät der Fa. ZEISS). Als Filmmaterial wurde der 10/10 DIN Film

Agepe der Fa. AGFA verwendet, den wir mit Final-Feinkorn (AGFA) oder Eukobrom (Fa. TETENAL) entwickelten. Die Fixierung erfolgte in Fixanal (AGFA) oder Express-Fixiersalz (TETENAL).

IC. Virushaltung und Virusreinigung

IC1. Virushaltung

Für alle Versuche wurde das Poliomyelitisvirus Typ 1 Stamm Mahoney verwendet.

Zur Herstellung des Stammvirus wurden gut ausgewachsene, 1-2 Tage alte, in ROUX-Flaschen angezüchtete HEp-2 Zellen verwendet. Zur Inokulation wurde das Anzuchtmedium abgesaugt und durch 20 ml Vorratsvirus (1 : 5 verdünnt in Nährmedium) ersetzt. Nach einer Adsorptionszeit von 30 min wurde das Inokulum abgesaugt, die Zellen einmal mit Nährmedium gewaschen und 60 ml Nährmedium mit 10 % inaktiviertem Kälberserum aufgegeben.

18 Std nach der Inokulation wurden die Zellen mit dem überstehenden Kulturmedium bei - 20° C eingefroren, wieder aufgetaut und durch Schütteln mit Glasperlen zerstört, wodurch zellgebundenes Virus freigesetzt wird. Die Zelltrümmer wurden 10 min bei 10.000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde als Stammvirus verwendet und bei - 70° C gelagert.

IC2. Virustiter

Die Titerbestimmung erfolgte nach der Plaquetechnik (DULBECCO et al., 1954) auf Monolayerkulturen von HEp-2 Zellen. Hierfür wurden gut ausgewachsene, 2 Tage alte Kulturen in FALCON-Petrischalen verwendet. Die zu untersuchende

Viruscharge wurde in EAGLE mem ohne Zusatz von Kälberserum in Stufen von 1 : 10 verdünnt. Pro Verdünnungsstufe wurden 2 Schalen mit je 0.3 ml beschickt.

Nach 30 min Adsorption in der Begasungsanlage wurde das Inokulum abgesaugt und die Zellen mit 5 ml Agar Overlay überschichtet. Nach 3-tägiger Inkubation in der Begasungsanlage wurde mit 3 ml Neutralrotlösung angefärbt. Die durch den Virus-CPE geschädigten Areale des Zellrasens (= 'plaques') sind nach 3-4 Stunden durch ihre schwächere Anfärbung zu erkennen. Für die Auszählung wurde die Verdünnungsstufe gewählt, die 10-50 Plaques pro Schale aufwies.

IC3. Virusreinigung

Die Virusreinigung erfolgte entsprechend der Methode von SCHAFFER et al. (1959).

Vorratsvirus wird 20 min bei 10.000 x g zentrifugiert (Ultrazentrifuge 'Omikron' der Fa. CHRIST, Osterode/Harz), das Sediment (mittlere Zellfraktion) verworfen und der gereinigte Überstand, in dem das Virus enthalten ist, erneut 90 min bei 90.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Sediment, bestehend aus Mikrosomen, Proteinaggregaten und Virus, wird in PBS resuspendiert, eingefroren und wieder aufgetaut, mit Glasperlen geschüttelt und nochmals bei 10.000 x g 10 min lang zentrifugiert. Das Sediment (grobe Proteinaggregate mit Mikrosomen) wird verworfen. Anschließend wird der Überstand mit Butanol ausgeschüttelt. Durch 10 min Zentrifugation bei 3000 x g trennt sich die wässrige Phase, in der das Virus enthalten ist, von der Butanolphase, in der die Proteinverunreinigungen gelöst sind.

Die Virusfraktion wird abpipettiert und drei weiteren Reinigungsschritten unterworfen: 90 min Zentrifugieren bei

90.000 x g (Überstand verwerfen, Virus im Sediment), Sediment resuspendieren in 20 ml PBS und nochmaliges Sedimentieren des Virus bei 90.000 x g 90 min lang (Überstand verwerfen).

ID. Versuchsaufbau

Bei jedem Versuch wurde von einer einheitlichen Zellpopulation ausgegangen, die in zwei gleiche Zellchargen geteilt wurde. Während die eine Serie (P) mit Poliomyelitisvirus in EAGLE mem inokuliert wurde, erhielt die Serie K gleichzeitig ein Phantominokulum, das aus dem gleichen Volumen EAGLE mem bestand. Alle anschließenden Operationen wurden für beide Serien gleichzeitig und auf identische Weise durchgeführt. Auch bei den Färbungen wurde darauf geachtet, daß die Präparate beider Serien sämtliche Arbeitsgänge gemeinsam in einem Färbekorb durchliefen. Durch diese Versuchsanordnung wurde erreicht, daß zu den polioinfizierten Präparaten jedes Versuches eine Serie von Kontrollpräparaten mitlief, die sich nur im Fehlen der Polioinfektion von der Versuchsserie (P) unterschied.

Einschichtgewebekulturen, die in FALCON-Schalen gewachsen waren, wurden am 1. Tag nach der Zellpassage mit Poliomyelitisvirus Typ 1 Stamm Mahoney infiziert. Der Inokulationstermin wurde als Zeitpunkt 0 bezeichnet. Nach 30-minütiger Adsorption bei 37° C wurde das Inokulum abgesaugt und Erhaltungsmedium aufgegeben.

Da die Chromosomen als c-Metaphasen dargestellt werden sollten, wurde jeweils 2 Std vor dem Erntetermin 0.05 µg/ml Colchizin(N-desacetyl-N-methyl-colchizin) = Colcemide (CIBA) appliziert. Zu diesem Zweck wurde das Erhaltungsmedium gegen ein mit Colchizin versetztes Medium ausgewechselt.

Die Chromosomen wurden sowohl im Verlauf eines vollständigen Poliomyelitisvirus-Reproduktionszyklus (P) als auch nach Hemmung der Reproduktion durch Guanidin (PG) untersucht. Im letzteren Fall wurden zwei Kontrollserien angefertigt: nicht infizierte Zellen, die den Inhibitor erhielten (G) und nichtinfizierte Zellen ohne Inhibitor (K).

Im folgenden soll ein Beispiel angeführt werden, aus dem der Versuchsansatz ersichtlich ist. Es werden die Volumenverhältnisse für das Inokulum, das Erhaltungsmedium und das Colchizinmedium wiedergegeben (Zahlenangaben in Milliliter).

MAHONEY = Poliomyelitisvirus Typ 1 Stamm MAHONEY in EAGLE mem

Guanidin = Guanidinstammlösung (1.25 mg/ml in EAGLE mem, Guanidin NBCo), endgültige Konzentration 250 µg/ml

EAGLE = EAGLE mem

Kälberserum = nicht inaktiviert

Colchizin = Colchizinstammlösung (1 µg/ml EAGLE mem, Colcemid CIBA), endgültige Colchizinkonzentration 0.05 µg/ml

V E R S U C H S A U F B A U

INOKULUM (2 ml je FALCON-Schale)

	K	G	P	PG
MAHONEY	-	-	1,2	1,2
Guanidin	-	1,2	-	1,2
EAGLE mem	5,4	4,2	4,2	3,0
Kälberserum	0,6	0,6	0,6	0,6
	6,0	6,0	6,0	6,0

ERHALTUNGSMEDIUM (5 ml je FALCON-Schale)

	K	G	P	PG
Guanidin	-	3,0	-	3,0
EAGLE mem	18,0	10,5	18,0	10,5
Kälberserum	2,0	1,5	2,0	1,5
	20,0	15,0	20,0	15,0

COLCHIZINMEDIUM (5 ml je FALCON-Schale)

	K	G	P	PG
Colchizin	1,0	0,75	1,0	0,75
Guanidin	-	3,0	-	3,0
EAGLE mem	17,0	9,75	17,0	9,75
Kälberserum	2,0	1,5	2,0	1,5

II. Auftreten von Chromatidbrüchen, diffusen Chromosomenveränderungen und c-anaphase-ähnlichen Chromosomen bei vollständigem Ablauf des Poliomyelitisvirus-Reproduktionszyklus

IIA. Beschreibung der drei Grundformen chromosomaler Veränderungen nach 6-stündiger Poliomyelitisvirus-Infektion in vitro

IIA1. Diploide Gewebestämme

a) Auswertung gut ausgebreiteter Metaphaseplatten

In den ersten Versuchen wurden diploide menschliche Gewebekulturen verwendet. Diese Zellen sind besonders geeignet, um zu untersuchen, ob das Poliomyelitisvirus Chromosomenveränderungen irgendeiner Form verursacht. Wie Vorversuche gezeigt hatten, verlief der Poliomyelitisvirus-Reproduktionszyklus in diesen Zellstämmen in üblicher Weise. Die Untersuchung der Zellen wurde nach einem 6-stündigen Infektionsablauf vorgenommen. Zu diesem späten Zeitpunkt war eine Veränderung der Chromosomen am ehesten zu erwarten, da dann der cytopathische Effekt deutlich ausgeprägt ist. Im weiteren Verlauf kommt es zur vollständigen Zerstörung der Zelle. Die Beobachtung von Chromosomen im Ablauf eines Polioreproduktionszyklus sollte deshalb nicht auf noch spätere Termine ausgedehnt werden.

Diploides foetales Intestinum (vgl. S. 4) wurde mit Poliomyelitisvirus Typ 1 Stamm Mahoney (MPI = 4 x 10^2 PFU/Zelle, Titer auf diploidem foetalen Intestinum) infiziert, Serie P, Entfernung des Inokulums und Aufgabe von Erhaltungsmedium nach 30 min Adsorptionszeit. 0.05 µg/ml Colchizin 3 Std nach Inokulation, Fixierung und histologische Aufarbeitung 6 Std nach Inokulation. Giemsafärbung. Die Kontrollzellen wurden mit Nährmedium inokuliert (Phantominokulum), sonst aber in völlig gleicher Weise behandelt, Serie K.

Bei allen Chromosomenanalysen der vorliegenden Arbeit wurden die Präparate blind ausgewertet. In einer ersten Erhebung wurden nur gut ausgebreitete Metaphasen verwendet. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Bruchfrequenzen in polioinfizierten Gewebekulturzellen (13 % = 23/180) gegenüber den nicht infizierten Kontrollzellen (6 % = 41/564). Nach dem Chi-quadrat-test erhält man eine Wahrscheinlichkeit von $P < 0.001$.

Alle beobachteten Brüche waren vom Chromatidtyp (Abb.6). Nur in 9 % derart geschädigter Metaphasen der Serie P handelte es sich um mehr als einen Bruch pro Platte (auf 23 Platten mit Brüchen kamen 2 Platten mit je zwei und 1 Platte mit 5 Brüchen). Auch in allen übrigen Versuchen waren diese Verhältnisse mehr oder weniger erhalten; über 95 % der geschädigten Zellen wiesen einen Chromatidenbruch pro geschädigte Zelle auf. Deshalb wurde die Gruppe der Brüche nicht weiter differenziert, und Zellen mit mehreren Brüchen wurden von solchen mit einem nicht getrennt registriert.

b) Verschlechterung der Metaphaseplattenqualität

Es war bei der Auswertung aufgefallen, daß in den Präparaten polioinfizierter Zellen die Zahl der schlecht ausgebreiteten, verklumpten Metaphaseplatten gegenüber den Kontrollserien eindeutig vergrößert ist. Um die Qualitätsverschlechterung von Metaphaseplatten zu erfassen, wurde eine Qualitätsskala aufgestellt. Die Gruppen 1 - 5 wurden positiv, die Gruppe 6 negativ definiert.

Gruppe 1: Für das jeweilige Gewebe charakteristischer Chromosomensatz, typische c-Metaphasechromosomen, gleichmäßig ausgebreitet, gut und gleichmäßig gefärbt, Metaphaseplatte nicht zerrissen (Abb.1-4).

Gruppe 2: wie 1, aber mit unwesentlichen Überlagerungen, oder bei Fehlen typischer c-Paare (Abb.7).

Gruppe 3: wie 2, doch werden auch schlecht gefärbte und zerrissene Platten verwendet, Überlagerungen können durch Mikroskopieren ohne großen Zeitaufwand geklärt werden (Abb.8).

Gruppe 4: wie 3, doch leichte Unklarheiten, die für die Auswertung ohne Bedeutung sind (Abb.9).

Gruppe 5: einzelne bis mehrere Unklarheiten, die die Auswertung erschweren (Abb.10).

Gruppe 6: noch als Mitose (Metaphase) erkennbar, keine detaillierte Auswertung möglich (Abb.11)

Prüft man die Häufigkeit in den einzelnen Klassen auf Homogenität, so erhält man $P \ll 10^{-10}$ bei $CHI^2 = 118$.

In allen Versuchen wurde die durchschnittliche Plattenqualität $\bar{Q} = Q_i/n$ bestimmt. $\bar{Q}$ ist in den polioinfizierten Zellen aller Versuche gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht (P immer $\ll 10^{-10}$). Abb.12 zeigt die deutliche Verschlechterung der Plattenqualität in dem soeben beschriebenen Versuch.

c) Auswertung aller Metaphaseplatten, unabhängig von ihrer Qualität

Für humancytogenetische Untersuchungen werden normalerweise nur gut ausgebreitete Metaphaseplatten mit wenigen Überlagerungen gewählt. In dem speziellen Fall unserer Untersuchungen mußten dagegen auch c-Metaphasen von schlechter Qualität herangezogen werden. Eine Selektion des Versuchsmaterials wäre ungerechtfertigt, da sie die entscheidenden und charakteristischen Effekte außer Acht gelassen hätte. Deshalb wurden in einer zweiten Erhebung je 500 Metaphaseplatten (der Serie K bzw. P) jeglicher Qualität analysiert. Bei den Brüchen ergab sich der bereits oben (S. 19) be-

schriebene Anstieg der Häufigkeit in polioinfizierten Zellen im Vergleich zu Kontrollpräparaten. Es wurden jedoch zwei weitere Typen der Chromosomenveränderung gefunden, die bei den ersten Untersuchungskriterien nicht erfaßt werden konnten: sogenannte schwere diffuse Chromosomenveränderungen (Abb.13) und c-anaphase-ähnliche Modifikationen ABB.14).

Viele Metaphaseplatten zeigen mehrere Veränderungen nebeneinander (Abb.15). Um einen besseren Überblick über die Summe der geschädigten bzw. nicht geschädigten Metaphasen zu erhalten, wurden die nichtgeschädigten in der Gruppe 0 zusammengefaßt aufgeführt. Bei weiteren Versuchen wurde zunächst die Gruppe 0 der Serien K und P ausgezählt und statistisch verglichen. Erst nach Erhalten einer Signifikanz wurde in einzelne Untergruppen (CA, 6D, B; vgl. S. 21-24) differenziert.

d) Beschreibung der drei verschiedenen Arten von Poliomyelitisvirus-induzierten Chromosomenveränderungen

α) C-anaphase-ähnliche Chromosomenmodifikationen (CA)

Die der c-Anaphase ähnliche Chromosomenmodifikation ist zum 6-Stunden-Zeitpunkt die ausgeprägteste Veränderung der Chromosomen polioinfizierter Zellen. Sie ist am eindeutigsten zu erkennen. Dadurch ist sie das beste Kennzeichen von polioinfizierten Präparaten. Die Brauchbarkeit dieses Parameters wird noch durch die niedrigen und konstanten Kontrollwerte (≈ 2 %) und die großen Häufigkeiten nach Polioinfekten (> 90 %) gesteigert.

Die Schwesterchromatiden haben sich trotz Colchizinapplikation auch im Kinetochor getrennt. Sie haben ihre defi-

nierte Zuordnung und räumliche Beziehung zueinander völlig verloren und liegen im Extremfall weit entfernt voneinander in der Metaphaseplatte (Abb.16). Wir finden zahlreiche Verdrehungen und Abwinkelungen der Chromatiden oft in Winkeln größer als 90 Grad. So entsteht eine Makrospirale, die an eine telophasische Entspiralisierung erinnert (vgl.S.79). Dieses Bild unterscheidet sich insofern von der c-Anaphase nach LEVAN (1938), als bei der klassischen c-Anaphase die Schwesterchromatiden parallel angeordnet sind und somit eine voneinander getrennte aber doch aufeinander gerichtete Lage aufweisen.

β) Schwere diffuse Chromosomenveränderungen (6D)

Die zweite polioinduzierte Veränderung entspricht den von BOIRON et al. (1966) für das Herpes simplex Virus beschriebenen "diffuse chromosome alterations". Vergleichbare Schäden wurden von zahlreichen Autoren für verschiedenste Wirtvirussysteme beschrieben (vgl. S. 87-90). Das gemeinsame Merkmal ist, daß die Schädigung nicht an einem distinkten Punkt des Chromosoms auftritt sondern diffus über das gesamte Chromosom verteilt ist.

Im Vordergrund steht die Auflockerung (Despiralisierung) der kompakten c-Metaphasechromosomen (Abb.17). Es treten zahlreiche Einschnürungen auf, bis hin zu einem perlschnurähnlichen Bild (Abb.18). Das noch erhaltene Chromatin fusioniert und bildet freie Chromozentren, verklumpte Areale und Chromatintröpfchen (Abb.11), sowie DNS-fädchen wie bei Pseudofragmentationen (WOLF, 1963). Das Chromatin ist Feulgen positiv und kann durch DNase[+)] (200 µg/ml, pH 7.2, 30 min, 37° C) vollständig abgebaut werden (vgl. S.60). Hinzu kommt, daß die Ränder der Chromosomen ihre scharfe Kontur verlieren und leicht wollig, nebelig oder milchig erscheinen. In späteren Stadien häufen sich vakuolisierte Chromatinbezirke (Abb.19). Zahlreiche Chromatinbröckchen

führen zum Bild der "Pulveration" (Abb.92) (NICHOLS et al., 1965). Da zwischen geringfügigen diffusen Veränderungen, die häufig auch in den Kontrollen zu finden sind, und schweren diffusen Schädigungen fließende Übergänge bestehen, wurden sicherheitshalber nur die diffusen Veränderungen aus der Qualitätsklasse '6' (= 6D = schwere diffuse Chromosomenveränderungen) registriert.

Es ist schwierig, diese Schäden von dem Bild der Karyorrhexis abzugrenzen (Abb.20). Ferner ist es bezeichnend, daß die schweren diffusen Chromosomenveränderungen nach Polioinfektion etwa gleichzeitig mit dem Eintreten des cytopathischen Effektes ihren Höhepunkt erreichen (vgl. S.2 + 26). Möglicherweise sind die diffusen Chromosomenschäden der Polio-CPE der Chromosomen.

+) DNase (3.1.4.5.), lyophil rein, aus Rinderpankreas, etwa 30.000 Dornase E/mg, SERVA, Heidelberg.

γ) Chromatidbrüche (B)

Als Chromatidbrüche wurden nur sogenannte echte Brüche registriert (SAX, 1940). Sie sind durch eine komplette Diskontinuität der Chromatide und die Dislokation des Fragments gekennzeichnet (Abb.21).
Färbelücken in einer Chromatide (achromatische Läsionen, gaps) wurden in die Auswertung nicht aufgenommen. Durch unsere Beobachtungen kommen wir zu dem Schluß, daß Färbelücken, die in einem engen Zusammenhang zu den sekundären Einschnürungen stehen, eher dem Bild der diffusen Chromosomenveränderung zuzuordnen sind (vgl. S.86-99, 99-105).

Wie die Tabelle 1 zeigt, ergab sich bei den Brüchen wiederum ein signifikantes Ansteigen der Frequenz von 3 % (= 19/564) in den Kontrollzellen auf 10 % (= 52/498) in den virusinfizierten Gewebekulturzellen. Der Chi-quadrat-test ergab ein

$P < 10^{-8}$ (Chi_1^2 in den Tabellen = x^2).

Schwere diffuse Chromosomenveränderungen traten nach Infektion in 20 % (= 101/498) aller analysierten Metaphasen auf (vergleichsweise 3 % = 18/564 in Kontrollzellen). Dieses Ergebnis ist statistisch gesichert ($Chi_1^2 = 78$, $P \ll 10^{-10}$).

Ebenso sind die c-Anaphasen mit 42 % (n = 221) gegenüber den Kontrollwerten (2 % = 8/300) signifikant erhöht ($Chi_1^2 = 129$, $P \ll 10^{-10}$).

Die Ergebnisse mit dem diploiden foetalen Intestinum konnten in zwei weiteren Versuchen an diploiden menschlichen Gewebekulturzellen reproduziert werden.

Diploide menschliche WI-38 Fibroblasten (embryonale menschliche Lunge) wurde mit Poliomyelitisvirus Typ 1 Stamm Mahoney (MPI = 10^3PFU/Zelle, Titer auf H.Ep.-2) infiziert. Nach 30 min Adsorption wurde das Inokulum abgesaugt und Erhaltungsmedium aufgegeben. Zugabe von 0.05 µg/ml Colchizin 4 h nach Inokulation, Fixierung und histologische Aufarbeitung 6 h nach Inokulation. Färbung der Präparate mit Orcein-Essigsäure, mikroskopische Auswertung im Phasenkontrast). Die Kontrollen (K) zu dieser Serie P wurden wie im Falle des diploiden foetalen Intestinums durch Phantominokulation gewonnen (vgl. S. 18-19).

Wie aus der Tabelle 1 hervorgeht, nahmen auch hier die drei beschriebenen Chromosomenveränderungen als Folge der 6-stündigen Polioinfektion zu. Die im Vergleich zu diploidem foetalen Intestinum großen Häufigkeiten für Brüche und schwere diffuse Chromosomenveränderungen in den Kontrollzellen können mit der hohen Passagezahl der Fibroblasten erklärt werden. Es zeigte sich bereits eine Polyploidisierung (polyploid 25 %) mit Pyknosen und einem auffallend niedrigem Metaphaseindex (c-Metaphaseindex nach 2 h Colchizin = 4 %) (vgl. S. 94). Der Versuch war trotzdem gut auswertbar. Die besondere Eignung des chromosomalen Merkmales CA ($Chi_1^2 = 158$, $P \ll 10^{-10}$) als Parameter der Polioinfek-

tion (K: 2 % = 2/123, P: 91 % = 62/68) war gerade in diesem Versuch besonders deutlich.
Die beiden Versuche mit WI-Zellen wurden wegen des geringen Mitoseindicis zusammengefaßt. Da die jeweiligen Kontrollen in der Gruppe 0 nach dem Chi-quadrat-test ein P = 0.02 ergaben, war die Zusammenfassung berechtigt.

IIA2. Aneuploide Gewebekulturzellen

Der 6-Stunden-Termin konnte zusätzlich 3 mal mit Zellen des aneuploiden, permanenten Zellstammes, HEp-2, reproduziert werden (Tabelle 1) (Abb. 22,23).

HEp-2 Zellen wurden mit Poliomyelitisvirus Typ 1 Stamm Mahoney inokuliert (MPI = 60 PFU/Zelle, bzw. 2 x 10^2PFU/Zelle, bzw. 10^3PFU/Zelle, alle Titer auf HEp-2 Zellen). Ersatz des Inokulums durch Erhaltungsmedium nach 30 min Adsorption. 0.05 µg/ml Colchizin 4 Std p.i., Fixierung und histologische Aufarbeitung 6 Std p.i., Giemsafärbung. Anfertigung der Serien K und P wie in der allgemeinen Methodik beschrieben (vgl. S. 18 + 19).

Die quantitative Übereinstimmung mit den Versuchen an diploiden Gewebekulturzellen ist hinreichend genau. Die Bruchhäufigkeit nach Polioinfektion ist in HEp-2 Zellen größer als in den diploiden Zellen; eine Erklärung könnte in der größeren Chromosomenzahl der HEp-2 Zellen liegen. Die Frequenz der CA liegt in unserem aneuploiden Zellstamm über der des diploiden foetalen Intestinums, da in letzterem Falle auch Prometaphasen registriert wurden (vgl. S. 87,88).

IIB. Zeitliches Auftreten von c-anaphase-ähnlichen Chromosomen, diffusen Chromosomenveränderungen und Chromatidbrüchen

Es erhob sich die Frage, zu welchem Zeitpunkt die c-anaphase-ähnlichen Chromosomen (CA), schweren diffusen Chromosomenveränderungen (6D) und Chromatidbrüche (B) erstmals signifikant vermehrt auftreten. Ferner sollte untersucht werden, ob sich die Häufigkeitskurven für die einzelnen Chromosomenveränderungen unterscheiden.

HEp-2 Zellen wurden mit Poliomyelitisvirus Typ 1 Stamm Mahoney zum Zeitpunkt 0 inokuliert. Die Infektionsmultiplizität betrug 60 PFU/Zelle. Ersatz des Inokulums durch Erhaltungsmedium nach 30-minütiger Adsorptionszeit. Jeweils 2 Std vor dem Erntetermin wurden 0.05 µg/ml Colchizin appliziert. Die zur 1. Std geernteten Zellen erhielten nur 1 Std lang Colchizin. In stündlichen Intervallen nach der Inokulation wurde die Häufigkeit der CA, 6D und B bestimmt. Die Chromosomen wurden hydrolysiert und nach GIEMSA gefärbt. Die Einzelheiten des Versuchsablaufes sind aus der Abb.24 ersichtlich.

Die Abb.25 zeigt die Häufigkeit der einzelnen Chromosomenveränderungen als Funktion der Zeit. Der früheste Zeitpunkt, an dem eine signifikante Erhöhung der Kontrollfrequenzen nachgewiesen werden kann, ist der 4-Stunden-Termin. Die Chi_1^2-Werte sind zusammen mit den zugehörigen Wahrscheinlichkeiten in der Tab. 2 aufgeführt. Ein erster Vergleich der Kurven von der 4. bis zur 6. Stunde nach der Infektion zeigt für den Parameter CA eine deutliche Zunahme von 2 % auf etwa 60 % zur 5. Stunde und annähernd 90 % zur 6. Stunde. Vergleicht man die Häufigkeitskurven von 6D und B, so erscheint ihr Verlauf ähnlich. Die statistische Analyse legt jedoch nahe, daß die Brüche geringfügig früher als die diffusen Schäden auftreten. Bei den späten Terminen liegt die Kurve für 6D deutlich über der für B. Sie zeigt, daß an diesen Terminen die schweren diffusen Chromosomenveränderungen vorherrschen. Da in vielen 6D-Metaphaseplatten

nicht mehr festgestellt werden kann, ob neben 6D auch B vorliegt (Abb.26), dürfte die tatsächliche Bruchfrequenz zur 5. und 6. Stunde noch über den durch Zählung ermittelten Werten liegen.

Statistische Untersuchungen: Für den Versuchsabschnitt von 0 bis 3 Stunden nach der Inokulation lassen sich alle drei Polygone mit der Probittransformation in Regressionsgeraden umwandeln. Diese verlaufen parallel zur Zeitachse. Die Chi_1^2-Werte und die zugehörigen Wahrscheinlichkeiten sind in der Tab. 4 enthalten. Sie zeigen, daß die Häufigkeit der drei Parameter in dem untersuchten Zeitabschnitt auf dem jeweiligen Kontrollniveau bleibt.

Analysiert man auf gleiche Weise das Verhalten der drei Chromosomenveränderungen während der 3. und 6. Stunde, so steigt jede der drei Kurven signifikant an. Außerdem sind die drei Kurvenläufe signifikant voneinander verschieden. Demnach handelt es sich um drei Vorgänge, die nicht unmittelbar voneinander abhängig sind. Diese Unterschiede lassen sich für 6D und B auch dann zeigen, wenn man die gesamte Versuchskurve (von der 0. bis zur 6. Stunde) nach der Winkeltransformation umwandelt.

6D: Chi_1^2 der Regression = 356 $P \ll 10^{-10}$
Chi_1^2 der Reststreuung = 7,9 P = 0,16
B Chi_1^2 der Regression = 70 $P \ll 10^{-10}$
Chi_1^2 der Reststreuung = 3,1 P = 0,7

Korrelation: Chi_1^2 der gemeinsamen Regression = 444
Chi_1 des Unterschiedes der b = 63
Korrelation: Chi_1^2 für die z = 14
Chi_1^2 der Reststreuung = 50

Das Experiment konnte in einem weiteren Versuch (ZIAC,, S. 28) bestätigt werden. In jedem Fall steigen die Häufigkeitskurven nach der 3. Stunde an; auch hier ist ihr Verlauf für die einzelnen Chromosomenschäden verschieden.

IIC. Kontrolluntersuchungen mit hochgereinigtem Poliomyelitisvirus

Bei der Herstellung von Vorratsvirus (IC1) und der Plaquetitration (IC2) gelangen Zelltrümmer und Enzyme in das Stammvirus. Da durch solche Verunreinigungen Chromosomenveränderungen hervorgerufen werden könnten, wurde für das folgende Experiment ein hochgereinigtes Poliomyelitisvirus durch Abtrennung der Zelltrümmer und der verunreinigenden Proteine hergestellt (IC3). Der Versuch sollte klären, inwieweit die gefundenen Chromosomenveränderungen von Verunreinigungen des Inokulums abhängen.

HEp-2 Zellen wurden mit hochgereinigten Poliomyelitisvirus Typ 1 Stamm Mahoney (MPI = 10^2PFU/Zelle) inokuliert. Ersatz des Inokulums durch Erhaltungsmedium nach 30-minütiger Adsorption. Applikation von 0.05 µg/ml Colchizin 2 Std vor der Ernte. Versuchseinzelheiten siehe Abb.24. Chromosomenfärbung GIEMSA oder FEULGEN.

Wie die Tab. 2 und 3 zeigen, ist die Häufigkeitsverteilung der Chromosomenveränderungen bei hochgereinigtem und nicht gereinigtem Virus die gleiche. Damit ist gezeigt, daß die Chromosomenveränderungen (CA, 6D und B) virusspezifisch sind und Verunreinigungen hierauf keinen Einfluß haben.

III. Ausbleiben der schweren diffusen Chromosomenveränderungen nach Hemmung des Infektionsablaufs durch Guanidin

IIIA. Beschreibung der chromosomalen Veränderung im Polioguanidinsystem

Im vorangegangenen Kapitel (II) wurde das Auftreten und Verhalten von Chromosomenveränderungen während eines voll-

ständigen Poliomyelitisvirus-Reproduktionszyklus beschrieben. Dieser ist durch die Bildung reifen Virus und die Zerstörung der Wirtszelle gekennzeichnet. In den folgenden Experimenten (III) wurden die Chromosomen im Fall der unvollständigen, guanidingehemmten Reproduktion untersucht. Die guanidingehemmte Reproduktion ist durch das Ausbleiben reifen Virus und das Fehlen des Polio-CPE charakterisiert. Guanidin hemmt die Bildung der Polio-RNS-Polymerase und das Auftreten der Replikativen-Form des Poliovirus (BABLANIAN, EGGERS und TAMM, 1965; EGGERS und TAMM, 1963). Bei der von uns verwandten Konzentration (250 µg/ml) kommt es selbst 24 Stunden nach der Inokulation zu keinem CPE und die Virusausbeute ist um 5 log 10 vermindert (HABERMEHL, 1966[b]). Frühe Stadien der Reproduktion werden von dem Inhibitor nicht betroffen, so daß die viruscodierte Hemmung zelleigener Protein-, RNS- und DNS-Synthese in gleicher Weise wie im Fall des vollständigen Reproduktionszyklus abläuft (VERWOERD et al., 1963; BALTIMORE et al.,1963; HABERMEHL, 1966 b). Das Fehlen eines cytopathischen Effektes im Polioguanidinsystem bringt es mit sich, daß die Zellen über einen längeren Zeitraum beobachtet werden können. Die für die frühen Stadien der Polioinfektion charakteristischen Abschaltvorgänge können somit esperimentell verlängert werden.

HEp-2 Zellen wurden zum Zeitpunkt 0 mit Poliomyelitisvirus Typ 1 Stamm Mahoney (MPI = 1.3×10^2 PFU/Zelle) inokuliert und gleichzeitig mit 250 µg/ml Guanidin behandelt (Serie PG). Es wurden zwei Kontrollen angefertigt: Serie G, die den Inhibitor in gleicher Konzentration wie PG erhielt, aber nicht infiziert war, und Serie K, die weder den Inhibitor erhielt noch infiziert war. Entsprechend dem Versuchsansatz in ID wurde nach 30-minütiger Adsorptionszeit das Inokulum abgesaugt und durch Erhaltungsmedium ersetzt. Die Serie K erhielt dabei EAGLE mem, die Serien G und PG erhielten EAGLE mem mit 250 µg/ml Guanidin. 2 Stunden vor der histologischen Aufarbeitung wurden 0.05 µg/ml Colchizin zugegeben. Der Untersuchungstermin war zur 14.Stunde nach der Inokulation. Die Chromosomen wurden mit Orcein-Essigsäure gefärbt.

Wie die Tab. 5 zeigt, ist die Frequenz der c-anaphase-

ähnlichen Chromosomen und der Chromatidbrüche wiederum erhöht. Die schweren diffusen Chromosomenveränderungen bleiben dagegen aus. Diese Ergebnisse sind hochsignifikant und voll reproduzierbar. Außerdem tritt ein colchizinähnlicher Effekt mit verklumpten Metaphasen und übermäßig kontrahierten Chromosomen auf (Kapitel IIIB , S. 31-33).

In einem weiteren Versuch wurden die CA, 6D und B nach 14-stündigem Polioguanidineinfluß mit oder ohne vorangegangener Metaphasearretierung durch Colchizin untersucht (Tab.6).

HEp-2 Zellen wurden mit Poliovirus (MPI = 65 PFU/Zelle) inokuliert und wie im letztbeschriebenen Versuch weiter verarbeitet. Doch wurden in diesem Versuch die drei untersuchten Zellchargen (K, G, PG) jeweils mit (Co+) oder ohne (Co-) Colchizinarretierung der Metaphasen untersucht. Chromosomenfärbung nach GIEMSA.

Chromatidbrüche sind nur in der Reihe PG erhöht. Hier erreichen sie sowohl bei Colchizinvorbehandlung als auch ohne Colchizinapplikation 17 % im Gegensatz zu einer durchschnittlichen Bruchfrequenz von 5 % in den übrigen Serien. Die Chromatidbrüche werden demnach bereits durch die frühen Stadien der Virusreproduktion verursacht.

Schwere diffuse Chromosomenveränderungen treten in keiner Serie häufiger als in den Kontrollen auf. Die durchschnittliche Frequenz beträgt 3 %. Die guanidingehemmte Reproduktion ist im Gegensatz zu der vollständigen nicht mehr in der Lage, die diffusen Schäden zu induzieren. Die Colchizinvorbehandlung hat auf die Verhältnisse bei den diffusen Veränderungen keinen Einfluß.

Eine interessante Zwischenstellung nehmen die c-Anaphasen ein. Durch Colchizinapplikation wird in nicht infizierten Kontrollzellen (K) das Auseinanderweichen im Centromer von

9 % (KCo-) auf 1 % (KCo+) erniedrigt. Die Paarung der Schwesterchromatiden im Centromer bleibt durch Colchizineinwirkung erhalten. Der gleiche Wert (2 %) ist in der Serie GCo+ vorzufinden. Guanidin allein (GCo-) bewirkt verglichen mit KCo- eine zusätzliche Steigerung des Auseinanderweichens im Centromer (9 % ----- 27 %). Noch größer ist die Häufigkeitszunahme durch Polioguanidin (PGCo- mit 60 %). Die guanidininduzierte Häufigkeitszunahme von CA kann durch Colchizineinwirkung verhindert werden (GCo-/27 % ----- GCo+/2 %), die durch PG bewirkte Zunahme aber nicht (PGCo-/60 % ----- PGCo+/56 %).

In dem Versuchsmaterial der Seite 33 wurden die CA zur 4., 9. und 13. Stunde nach der Inokulation für das Polioguanidinsystem bestimmt (PGCo-). Die Kontrollpolygone für die Serien KCo++ und GCo++ (Co++ symbolisiert, daß in diesen Serien das Colchizin vom Zeitpunkt der Inokulation bis zum Untersuchungstermin einwirkte) steigen leicht an (von 1 % auf 10 %). Dieser Anstieg kann durch auftretende c-Anaphasen erklärt werden, die für langzeitige Colchizineinwirkung von LEVAN (1938) beschrieben wurden. Signifikant verschieden ist der Anstieg in der Serie PGCo-, wie die Abb. 35 und die Tab. 7 zeigen. Dieser Anstieg ist zwischen der 4. und 9. Stunde nach der Inokulation am steilsten.

IIIB. Colchizinähnliche Wirkung von Guanidin

Nach Untersuchungen von HABERLEHL et al. (1969) kommt es spät nach der Guanidinhemmung des Poliomyelitisvirus-Reproduktionszyklus zu pathologischen Metaphasefiguren mit allozyklischen Elementen (Abb.27) und zu einem colchizinähnlichen Effekt. Die Mitose wird ähnlich wie durch Colchizin in der Metaphase arretiert und kann nicht mehr in die Anaphase eintreten. Demnach liegt hier ein echter colchizin-

ähnlicher Effekt vor, wogegen die in den ersten Stunden beobachtete, polioinduzierte Steigerung des Mitoseindex auf einem vermehrten Eintreten von Interphasezellen in die Mitose beruht (HABERMEHL, 1966a,b). Chromosomenuntersuchungen sollten prüfen, ob sich auch auf dem Niveau des Chromosoms ein colchizinähnlicher Effekt nachweisen läßt. Um den Effekt zu beschreiben, haben wir zwei Parameter gewählt. Sie werden den Untersuchungen von LEVAN (1938) entsprechend wie folgt definiert:

1. VK: Die Chromosomen erfahren durch die Einwirkung von Colchizin eine Verkürzung (Chromosomenverkürzung).
2. AU: Die Schwesterchromatiden sind nach Colchizinapplikation nicht mehr durch 'relational coiling' miteinander verbunden. Nach einem 'uncoiling' weichen sie zunächst an interstitiellen und später an terminalen Berührungspunkten auseinander (Auseinanderweichen der Chromatiden).

Im Versuchsmaterial der Seite 30 wurden die Häufigkeiten der VK und AU in den 6 Versuchsgruppen bestimmt. Die Abb.28-32 zeigen je eine typische Metaphaseplatte von fünf Zellchargen. Vergleicht man in Tab. 8 die Häufigkeiten in den Spalten KCo- und KCo+, so erkennt man, daß die gewählten morphologischen Kriterien (VK und AU) zur Beschreibung des Colchizineffektes geeignet sind: nach 2 -stündiger Colchizinapplikation kommt es zu einer deutlichen Verkürzung der Chromosomen (KCo-/47 % VK ----- KCo+/95 % VK) und dem erwarteten Auseinanderweichen der Schwesterchromatiden (KCo-/36 % AU ----- KCo+/73 % AU). Aus dem Vergleich der Spalte GCo- mit den K-Spalten geht hervor, daß Guanidin allein (ohne Colchizin) bereits eine Verkürzung der Chromosomen und ein Auseinanderweichen der Chromatiden bewirkt. Zusätzliche Colchizinapplikation (GCo+) führt zu den gleichen Werten wie bei colchizinbehandelten Kontrollzellen (KCo+).

Die Spalten PG zeigen bezüglich VK als auch AU einen eindeutigen Co-Effekt, der von der Präsenz des Colchizins unabhängig ist. Wahrscheinlich hat Polioguanidin schon frühzeitig einen starken Co-ähnlichen Effekt entwickelt, so daß zur 12. Stunde für 2 Stunden appliziertes Colchizin den Effekt weder verstärken, noch das für Co atypische Auseinanderweichen der Chromatiden im Centromer verhindern kann. Ein Vergleich der mittleren Fehler (Abb.33) zeigt, daß sich der deutliche Co-Effekt in PG 14 Stunden nach der Inokulation als additive Wirkung von P und G verstehen läßt.

In einem weiteren Versuch wurde als neue Variable die Zeit eingeführt, und die Parameter VK und AU in den Serien KCo++, GCo++ und PGCo- untersucht.

Versuchsansatz und -ablauf gehen aus dem Schema in Abb.34,35 und der Aufstellung auf Seite 36 hervor. Im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Versuchen wirkte hier das Colchizin während der gesamten Versuchsdauer ein (symbolisiert durch Co++). Die MPI des Poliomyelitisvirus betrug 1.9 x 10^2PFU/Zelle. Die endgültige Konzentration des Guanidins war250 µg/ml, die des Colchizins 0.05 µg/ml. Die Chromosomen wurden nach GIEMSA gefärbt.

Abb.35 zeigt die zeitabhängige Zunahme der Parameter VK und AU in allen drei Versuchsgruppen. Hiermit wird der colchizinähnliche Effekt nochmals demonstriert und gezeigt, daß er schon nach den ersten vier Stunden annähernd vollständig ausgeprägt ist.

IIIC. Häufigkeitszunahme spontaner Endoreduplikationen nach Guanidinapplikation

In den Präparaten eines Versuches wurden spontane Endoreduplikationen (Abb.36) gefunden. Sie wurden in den Versuchsgruppen KCo+, GCo+ und PGCo+ bei zwei Terminen (8 und

27 Std. p.i.) ausgezählt (Tab. 9); die Häufigkeiten der einzelnen Gruppen wurden statistisch verglichen, um eine Aussage über die Abhängigkeit der Endoreduplikationen von Guanidin bzw. Polioguanidin treffen zu können. Da es sich meist um seltene Ereignisse (definiert durch $n \cdot p < 10$, wobei n der Umfang der Stichprobe und p die Wahrscheinlichkeit des Eintretens des Ereignisses ist) handelte, wurde der Chi^2-Test mit der YATES'schen Korrektur verwendet.

Versuchsaufbau wie auf Seite 16,17 mit folgenden Ausnahmen: MPI = 10^2PFU/Zelle, Untersuchungstermine 8 und 27 Stunden nach der Inokulation.

Als Zeitpunkt für das Zustandekommen einer Endoreduplikation sehen SCHWARZACHER und SCHNEDL (1965a.b., 1966) und SCHNEDL (1967) die vorhergehende Syntheseperiode an. Eine 8-stündige Polioinfektion (1.Termin) kommt hiernach als Ursache der Endoreduplikationen nicht in Betracht. Andererseits muß erwartet werden, daß 27 Stunden nach der Inokulation (2.Termin) die Zahl der Endoreduplikationen wieder auf dem Kontrollniveau angelangt ist. Die Unterschiede für K1/K2 und G1/G2 sind gut gesichert. Im Falle der 27-stündigen Einwirkung von PG ist der Mitoseindex so stark abgesunken, daß nur noch 23 Metaphasen gefunden wurden. So ergibt sich die ungünstige Relation von 0/23, die bei Vergleich von PG 1 und PG 2 zu keinem signifikanten Unterschied führt. Vergleicht man die Häufigkeit aller Endoreduplikationen beider Termine, so ergibt sich eine signifikante Abnahme von der 8. bis zur 27 Stunde ($P \ll 10^{-10}$). Das Material des zweiten Termines ist homogen und weist im Gegensatz zum ersten Termin (4 %) eine Endoreduplikationsrate von 3 % (vgl. OBE,1965) auf. Bei dem frühen Termin konnte eine signifikante Erhöhung der Endoreduplikationsrate unter Guanidin ($P = 10^{-9}$) und eine signifikante Erniedrigung unter Polioguanidin ($P = 5 \times 10^{-6}$) nachgewiesen werden.

IV. Ausbleiben der Chromosomenveränderungen nach Inokulation poliounempfänglicher Zellen

In allen bisher beschriebenen Experimenten (II und III) wurden menschliche (!) Gewebekulturzellen verwendet. Diese ermöglichen den vollen Ablauf des Poliomyelitisvirus-Reproduktionszyklus. Durch einen Versuch mit Mäusefibroblasten (in denen keine Polioreproduktion stattfindet) sollte geklärt werden, ob bereits sehr frühe Stadien der Virusreproduktion (Adsorption und Penetration) die Chromosomen der Wirtszelle beeinflussen. Ferner sollte ein toxischer Effekt des Poliovirus als Ursache der Chromosomenveränderungen ausgeschlossen werden.

Mäusefibroblasten (vgl. IA3) wurden am 1. Tag nach der 2. Passage mit Poliomyelitisvirus Typ 1 Stamm Mahoney (MPI = 7 x 10^2 PFU/Zelle) inokuliert. Nach 1-stündiger Adsorption wurde das Inokulum durch Nährmedium ersetzt. Parallel angesetzte Kontrollen wurden zum Zeitpunkt 0 phantominokuliert und ebenfalls zur 1. Stunde mit frischem Nährmedium versehen. 11 Stunden nach der Inokulation wurden 0.05 µg/ml Colchizin appliziert. Die Zellen wurden zur 15. Stunde aufgearbeitet und die Chromosomen mit Orceinessigsäure gefärbt. Morphologisch waren keine cytopathischen Veränderungen nachweisbar, eine Virusreproduktion hatte nicht stattgefunden.

Es wurden je 50 Metaphaseplatten der Serie K und P analysiert. Sie zeigten keinerlei Unterschiede. Vergleicht man die Häufigkeiten von Zellen der Gruppe '0', so erhält man Chi^2_1 = 2.3 und P = 0.15. Keiner der drei für das Poliovirus beschriebenen Chromosomenschäden (CA, 6D, B) trat signifikant erhöht auf. Die Häufigkeiten der CA, 6D und B sind in der Serie K: 6 % CA, 2 % 6D und 2 % B; und entsprechend in Serie P: 6 % CA (P = 1.0), 6 % 6D (P = 0.3) und 8 % B (P = 0.2).

C O L C H I Z I N - Ä H N L I C H E R E F F E K T

i m P O L I O G U A N I D I N - S Y S T E M

INOKULATIONSPLAN (Volumenangaben in ml)

E = EAGLE minimum essential medium
KS = Kälberserum, nicht inaktiviert
Co = Colchizinstammlösung
G = Guanidinstammlösung
MAH = Poliomyelitisvirus Typ 1 Stamm MAHONEY

Inokulum: (3 ml je Schale)

	K Co ++	G Co ++	PG Co -
E	11,1	8,7	6,3
KS	0,3	0,3	0,3
Co	0,6	0,6	-
G	-	2,4	2,4
MAH	-	-	3,0
	12,0	12,0	12,0

Mediumwechsel: (5 ml je Schale)

E	17,0	13,0	14,0
KS	2,0	2,0	2,0
Co	1,0	1,0	-
G	-	4,0	4,0
MAH	-	-	-
	20,0	20,0	20,0

V. Zwischenergebnis

Die beschriebenen Versuche (Teil I) zeigten, daß eine Poliomyelitisvirusinfektion (Typ 1 Stamm Mahoney) von Gewebekulturzellen zu drei verschiedenen Chromosomenveränderungen führt: c-anaphaseähnliche Chromosomen, schwere diffuse Chromosomenveränderungen und Chromatidbrüche. Voraussetzung ist, daß die Wirtszelle für das Poliovirus empfänglich ist.

Ferner wurde der komplette Virusreproduktionszyklus und die unvollständige, durch Guanidin gehemmte Reproduktion gegenübergestellt. Dabei ergab sich, daß die Erhöhung der Bruchfrequenz und das Zunehmen der c-Anaphasen nicht an das Vorhandensein einer kompletten Reproduktion gebunden ist. Im Gegensatz dazu sind für ein vermehrtes Auftreten von diffusen Chromosomenveränderungen späte Stadien der Virusreproduktion verantwortlich. Dadurch wird ein enger Zusammenhang zwischen Polio-CPE und diffusen Chromosomenveränderungen nahegelegt. Es wäre möglich, daß im späten Verlauf der Infektion Enzyme aus den Lysosomen der Wirtszelle freigesetzt werden, und daß diese Hydrolasen die diffusen Schäden als Spezialfall des Polio-CPE hervorrufen. Diese Arbeitshypothese wurde in den Versuchen der Teile II und III geprüft.

Teil II

Beziehung zwischen Chromosomenveränderungen, Poliomyelitisvirusreproduktion und lysosomalen Enzymen

I. Einführung

In Teil I wurden die polioinduzierten Chromosomenschäden beschrieben. Dem vollständigen Reproduktionszyklus wurde die unvollständige, durch Guanidin gehemmte Reproduktion gegenüber gestellt. Im Laufe einer kompletten Virusreproduktion kam es zu Chromatidbrüchen, c-anaphase-ähnlichen Bildern und schweren diffusen Chromosomenveränderungen. Wurde der Reproduktionszyklus durch Guanidin gehemmt, so fehlten die diffusen Chromosomenveränderungen. Für die letztgenannten Schäden sind demnach die späten Stadien des Infektionsablaufes entscheidend. Da die diffusen Veränderungen eng mit dem Polio-CPE zusammenhängen, stellten wir die Arbeitshypothese auf, daß hierfür lysosomale Enzyme verantwortlich sind, die spät im Infektionsablauf freigesetzt werden.

Die Versuche des zweiten Teils der vorgelegten Arbeit sollten klären, ob in polioinfizierten Zellen die lysosomale Aktivität erhöht ist. Dafür wurden die saure DNase und die saure Phosphatase in partikelfreien Zellhomogenaten bestimmt.

II. Material und Methodik

IIA. Versuchsaufbau

In allen Versuchen wurden HEp-2 Zellen verwendet. Da für die Enzymbestimmungen ein großes Zellmaterial erforderlich ist, wurden je Untersuchungstermin 3 ROUX-Flaschen

(2×10^8 Zellen) aufgearbeitet. Entscheidend war, alle Präparationen rasch und in der Kälte (+ 4° C) auszuführen, um einen vorzeitigen Aktivitätsverlust zu vermeiden. Die Operationen wurden in saurem isotonem Puffer (pH 5.0) durchgeführt.

Die freien lysosomalen Enzyme wurden im partikelfreien Grundplasma bestimmt. Die Präparation beruhte auf schonender Homogenisation der Zellen (so daß die Zellen, nicht aber die Ruhekerne zerbrochen werden) und Abtrennung der partikulären Fraktionen durch Differentialzentrifugation. Nach dieser Methode wurde ein klares Plasma gewonnen, das als Enzymlösung Verwendung fand. Saure lysosomale DNase und Phophatase wurden nach den im Abschnitt IIB beschriebenen Methoden bestimmt.

Im einzelnen wurden folgende Arbeitsschritte ausgeführt:

In mehreren Vorversuchen wurden die Zeiten für die einzelnen Arbeitsgänge bestimmt. So konnten später größere Versuche mit stündlichen Untersuchungsterminen geplant und durchgeführt werden.

1. Ablösen der Zellen aus dem Kulturgefäß (3 ROUX-Flaschen) mit einem Gemisch von Trypsin und Versen (wie Schema auf S. 7)
2. Zweimal waschen in isotoner, eiskalter PBS (pH 7.0), die mit 10 % Kälberserum versetzt war. Abtrennen der Zellen bei 800 x g für 5 min, Überstand verwerfen
3. Sediment (etwa 0.9 ml bei 3 ROUX-Flaschen) in 40 ml eiskaltem Acetatpuffer resuspendieren (isoton, pH 5.0, s.u.), Abtrennen der Zellen bei 800 x g für 5 min, Überstand verwerfen
4. Sediment resuspendieren in 1,35 ml kaltem, hypotonem Acetatpuffer pH 5.0 (s.u.)
5. Homogenisieren mit dem DOUNCE-Homogenisator Pistill B (80 Schläge) im Eisbad

6. Herstellung der Isotonie durch Zugabe von 0.15 ml hypertonem Acetatpuffer pH 5.0 (s.u.)
7. Sedimentieren unzerstörter Zellen, Zellkerne und Zelldetritus für 15 min bei + 4° C bei 4000 x g (Ultrazentrifuge 'OMEGA' der Fa. CHRIST), Sediment verwerfen
8. Sedimentieren der Mitochondrien und Lysosomen bei 12.000 x g 1 Stunde lang bei + 4° C, Sediment verwerfen
9. Der Überstand wurde als "Grundplasma" bezeichnet. Er enthält neben gelösten Enzymen submikroskopische Bestandteile in der Größenordnung von Mikrosomen (vgl. die Schemata in Abb.37 + Abb.85)

Acetatpuffer, pH 5.0

isoton:	1.36 g Natriumacetat + 3 H_2O (MERCK, p.a.) + 27 ml 0.1 n Essigsäure (MERCK, p.a.) + 8.12 g NaCl (MERCK, p.a.) ad 1000 ml mit aq.bidest.
hypoton:	wie isoton aber ohne NaCl
hyperton:	wie isoton aber mit 81.2 g NaCl (= 10-fach isoton)

Bei der Bestimmung der Enzymaktivität wurden entweder nicht infizierte Kontrollzellen eines Untersuchungstermines als 100 % Wert gesetzt und alle anderen Werte auf diesen bezogen (S. 50 u.), oder es wurden zu jedem Untersuchungstermin nicht infizierte Kontrollzellen aufgearbeitet (S. 49 u.). Im letzteren Fall wurde der Kontrollwert jeweils von der Aktivität der infizierten Zellen subtrahiert und die Differenz der Extinktionen direkt angegeben.

Die Ergebnisse sind qualitativ reproduzierbar. Wegen der Schwankungen in den jeweils verwendeten Zellpopulationen ist es erforderlich, in jedem Versuch entsprechende Kontrollen mitzuführen, auf die die Versuchswerte zu beziehen sind.

IIB. Lysosomale Testenzyme

IIB1. Saure DNase

Die im Grundplasma enthaltene DNase spaltet die als Substrat angebotene hochpolymere DNS in niederpolymere Bruchstücke (hauptsächlich Oligonucleotide, in geringem Maße Dinucleotide (vgl. HARBERS, 1964)). Diese haben das gleiche Extinktionsspektrum wie hochpolymere DNS. Nach zweistündiger Inkubation wird die Enzymreaktion durch ein Gemisch von Uranylacetat und Perchlorsäure unterbrochen. Dabei werden die hochpolymere DNS und die Proteine in der Kälte ausgefällt. Das Präzipitat wird abzentrifugiert. Im Überstand bleiben die durch DNase freigesetzten Nukleotide in Lösung (Probe E). Ihre Menge ist ein Maß für die enzymatische Aktivität des Enzyms; sie ist der Extinktion bei 260 m µ proportional.

Die Extinktion wurde gegen eine Kontrolle (Probe K) gemessen, die sich dadurch unterschied, daß dem Grundplasma das Fällungsgemisch gleichzeitig mit dem Substrat zugesetzt wurde. Der Leerwert K (gegen Aq.dest. gemessen) gibt die zu Beginn der Reaktion in Probe E enthaltene Nucleotidmenge an. Die Differenz E - K ist das Maß für die zweistündige Enzymreaktion.

Wie in Schema 38, Teil II gezeigt wird, wurden Proben des Grundplasmas zu 0.4 ml 2 Stunden lang bei 37° C einer 0.05 %-igen Lösung hochpolymerer DNS in 1.1 ml isotonem NaCL-Natriumacetat-Puffer pH 5.0 inkubiert. Nach 2 Stunden wurde die Reaktion durch 1.4 ml 0.25 % Uranylacetat (MERCK, p.a.) in 4 % $HClO_4$ (MERCK, p.a.) unterbrochen. Nach 20-minütiger Fällung bei + 4° C wurde das Präzipitat durch Zentrifugation bei 10.000 x g für 20 min (+ 4° C) abgetrennt und der Überstand 1:10 mit Aq.bidest. verdünnt. Die Extinktion von E gegen K wurde bei 260 m µ im Spektralphotometer (ZEISS, PMQ II) gemessen.

In einzelnen Fällen wurde das gesamte UV-Absorptionsspektrum von 220 bis 300 m μ in Intervallen von 5 m μ bestimmt (vgl. Abb.43).

Wie bei fast allen Extraktionen biologischen Materials handelt es sich auch in unserem Falle um Gemische von Nukleinsäuren und Proteinen. So sind die Extinktionen in Abb.39 + 40 als Mischspektren anzusehen, da sich die Absorptionskurven von Proteinen und Nukleinsäuren überlagern. Die maximale Absorption der Nukleinsäuren liegt bei 260 m μ = x-Maximum. Das y-Maximum liegt bei 190 m μ (TARNOK und RÖHRSCHEIDT, 1968), das Minimum bei 230 m μ. Die maximale Absorption der Proteine erfolgt bei 280 m u (vgl. RAUEN, 1956). Der Gehalt von Nukleinsäuren und Proteinen kann in solchen Gemischen annäherungsweise aus den $E_{260\ m\mu}$ und $E_{280\ m\mu}$ bestimmt werden. Sofern eine Mischlösung nicht mehr als 15 % Nukleinsäuren enthält, kann der Proteingehalt nach WARBURG et al., 1941 durch die Gleichung

$$F \times \text{Absorption bei } 280\ m\mu = \text{mg Protein / ml}$$

errechnet werden. Den WARBURG'schen Korrektionsfaktor (F) kann man an Hand des Verhältnisses $E_{280\ m\mu} / E_{260\ m\mu}$ einer von WARBURG aufgestellten Tabelle entnehmen. Liegt der Nukleinsäuregehalt über 15 %, so ist die Absolutmenge an Nukleinsäure in erster Näherung nach der Regel:

$$50\ \mu g / ml \text{ Nukleinsäure} = \text{Extinktion } 1.0$$

zu ermitteln, da die Absorption der Proteine bei 280 mμ dann kaum noch ins Gewicht fällt. Der Proteingehalt derartiger Lösungen wird nach LAYNE (1951) gemäß der Formel:

$$mg / ml \text{ Protein} = 1.55 \times Abs_{280\ m\mu} - 0.76 \times Abs_{260\ m\mu}$$

oder nach KALCKAR (1947):

$$mg / ml \text{ Protein} = 1.45 \times Abs_{280\ m\mu} - 0.74 \times Abs_{260\ m\mu}$$

berechnet.

Beispiel

zu Abb. 39, 40:

$E_{260m\,\mu} = 0{,}950$ $E_{280\,m\,\mu} = 0{,}530$

DNS-gehalt > 15 %: 47,5 µg DNS/ml

Einwaage : 50 µg DNS/ml

Proteingehalt : 0,1 µg Protein/ml (nach LAYNE)
0,6 µg " " (nach KALCKAR)

Der Vergleich des berechneten DNS-Gehaltes und der verwendeten Substratmenge zeigt, daß die eingewogene DNS-Menge tatsächlich gelöst vorlag.

Die Lösung der hochpolymeren DNS gestaltete sich schwierig. Es hat sich bewährt, die abgewogene DNS in Aq.bidest. (1/10 des endgültigen Volumens) über Nacht im Kühlschrank vorquellen zu lassen und dann mit isotonem Puffer aufzufüllen. Der Lösungsprozeß benötigte mehrere Stunden, und die einzelnen Lösungsmittel müssen tropfenweise, mit langen zeitlichen Zwischenabständen zugegeben werden.

Als DNS-Substrat wurde zunächst Lachssperma-DNS der Fa. SERVA (hochpolymer, lyophilisiert, Spektrum in Abb.42) später Kalbsthymus-DNS der gleichen Firma verwendet (E_{max} = 258 m µ, E_{min} = 230 m µ, MG etwa 4 x 10^6 · Spuren von RNS, proteinfrei). Eine Extinktionskurve der Kalbsthymus-DNS zeigt die Abb. 42.

Inkubationszeit

Entsprechend der Arbeit von MALUCCI et al. (1965) wurde anfänglich 1 Stunde für die Inkubation gewählt. Doch zeigten Vorversuche (Abb.39,40), daß nach 2-stündiger Einwirkung von DNase wesentlich höhere Extinktionsdifferenzen erhalten

werden. Deshalb wurden die Hauptversuche mit 2-stündiger Inkubation durchgeführt.

Magnesiumchlorid

Da empfohlen wird, DNase-Reaktionen durch Zugabe von Mg^{++} zu begünstigen (vgl. RAUEN, 1956), wurde dem Acetatpuffer anfänglich 0.5 mM $MgCl_2$ (MERCK, p.a.) zugesetzt. Wiederholte Vorversuche zeigten jedoch (Abb.39,49), daß in unserem Versuchssystem die Extinktionsdifferenzen der sauren DNase mit abnehmender $MgCl_2$-Konzentration wachsen. Die höchsten Werte wurden bei völligem Fehlen des $MgCl_2$ erreicht. Deswegen wurden bei den Hauptversuchen keine Mg^{++}-Ionen verwendet.

Extinktionen der verwendeten Puffer und des Fällungsmittels

Die $E_{260\ m\mu}$ von PBS betrug 0.012, die von isotonem Acetatpuffer pH 5.0 betrug 0.011. Beide Extinktionen sind gegen Aq.bidest. gemessen.

Weiterhin wurde die Extinktion des Fällungsgemisches bestimmt. Ausgehend von einer 1:2-Verdünnung des in den Versuchen verwendeten Fällungsgemisches wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt. Die Verdünnung erfolgte in isotonem Acetatpuffer pH 5.0. Abb. 53 zeigt die $E_{260\ m\mu}$ gemessen gegen Aq.bidest. als Funktion der Konzentration des Fällungsgemisches. Im Gegensatz zu den Puffern ergeben sich hohe Extinktionswerte.

IIB2. Saure Phosphatase

Der Nachweis der sauren Phosphatase erfolgte entsprechend der Arbeit von BESSEY et al. (1946) mit dem BÖHRINGER-Farbtest TC-Q, Art.No.: 15988.

Hierbei wurde 5.5 mM p-Nitrophenylphosphat-Natriumsalz in 0.05 M Citratpuffer pH 4.8 als Substrat verwendet. Proben des Grundplasmas zu 0.2 ml wurden 30 min lang bei 37° C in 1.0 ml Substrat inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml 0.3 M NaOH unterbrochen. Die Messung des durch die Hydrolyse freigesetzten p-Nitrophenol erfolgte spektralphotometrisch bei 405 m µ gegen Kontrollproben. Zur Herstellung der Kontrollen wurde die NaOH bereits zu Beginn der Enzymreaktion zugesetzt (vgl. Schema 41).

Die Extinktionen sind ein Maß für die Enzymaktivität. Multipliziert man sie mit dem Faktor 101, so erhält man die Phosphatasewerte in mU/ml . 1 mU entspricht 0.06 mMol-Einheiten nach BESSEY-LOWRY.

IIC. Erfassung der freien und der partikelgebundenen lysosomalen Aktivität

IIC1. Freie lysosomale Aktivität

Um eine Zunahme der lysosomalen enzymatischen Aktivität im Plasma polioinfizierter Zellen registrieren zu können, mußten in Vorversuchen zwei Referenzwerte ermittelt werden: die freie lysosomale enzymatische Aktivität und die lysosomale Gesamtaktivität. Die freie Aktivität ist die nicht partikelgebundene, im Grundplasma einer Zelle vorhandene Aktivität, die nach schonender Homogenisation der Zellen und nach Sedimentation aller Partikel im Überstand der Zellfraktionen bestimmt wird.

Nicht infizierte HEp-2 Zellen wurden nach Schema 37 behandelt und aufgearbeitet. Bei diesem Versuch unterblieb die hypotone Vorbehandlung, um Aktivitätsverluste zu vermeiden (vgl. KRISCH, 1966). Die Zellen wurden ständig unter isotonen Bedingungen gehalten. Die saure DNase und die saure Phosphatase wurden wie auf Seite 41-45 bestimmt.

Das Diagramm 43 zeigt das für die saure DNase charakteristische Spektrum. Die Differenz beträgt $E_{e/260} - E_{k/260} = 0.003$. Das besagt, daß in nicht infizierten Kontrollzellen keine enzymatische Aktivität der sauren DNase im Grundplasma nachweisbar ist. Die Methodik ist somit geeignet, einen Anstieg der freien Aktivität nach Virusinfektionen zu erfassen. Die Zerstörung der Zellen im DOUNCE-Homogenisator und die anschließenden Arbeitsgänge mit der Ultrazentrifuge führen zu keiner artifiziellen Freisetzung der lysosomalen Enzyme.

Die freie Aktivität der sauren Phosphatase wurde in 1:10 verdünnten Proben bestimmt. Die Extinktionsdifferenz $E_{e/405} - E_{k/405}$ betrug $0.060 \pm 15\ \%$. Dies entspricht einem Phosphatasewert von 6 mU/ml. Die relativ hohen Schwankungen bei den Phosphatasebestimmungen erschweren die Reproduktion der Ergebnisse. Deswegen wurden die Hauptversuche vornehmlich auf die saure DNase gestützt. Die möglichen Ursachen für die schlechte Reproduzierbarkeit der sauren Phosphatasewerte untersuchten CRISTOFALO et al. (1967) an WI-38 Zellen. Die Autoren zeigten, daß zwei verschiedene Phosphatasen vorliegen (Tartrathemmbar oder nicht hemmbar), die in den einzelnen Zellorganellen unterschiedlich verteilt sind. Bestimmungen der Phosphatasegesamtaktivität ergaben folgende Verteilung auf die einzelnen Zellfraktionen: 50 % lysosomal, 19 % nuclear, 16 % mikrosomal und 15 % im Überstand. Auch diese Verteilung zeigt, daß die saure Phosphatase kein günstiges Leitenzym für die Lysosomen ist.

IIC2. Lysosomale Gesamtaktivität

Die Gesamtaktivität wurde nach quantitativer Freisetzung der lysosomalen Enzyme durch Ultraschall bestimmt. Ein Schema der einzelnen Arbeitsschritte zeigt die Abb. 44. Die trypsinierten und gewaschenen HEp-2 Zellen wurden in einem Eisbad 5 min lang in dem MSE-Disentegrator beschallt (60 Watt, 20.000 Hz).

Nach Ultraschallbehandlung betrug die Extinktionsdifferenz für die saure DNase $E_{e/260} - E_{k/260} = 0.271$. Diese Versuche wurden mehrfach unter geringfügigen Variationen der experimentellen Bedingungen (pH, Inkubationszeit, Hypotonie, Mg^{++}-Ionenkonzentration) wiederholt. Sie zeigten in jedem Fall, daß der geringen freien lysosomalen Aktivität eine hohe partikelgebundene Aktivität gegenübersteht. Somit eignen sich die experimentellen Bedingungen, um einen Anstieg der freien Aktivität nach Virusinfektionen zu erfassen.

Weiterhin wurde untersucht, ob bei der hohen Gesamtaktivität die Substratmenge ausreichend ist. Die Funktion $E_{260\,m\mu} = f$ (conc. EXTRAKT) verläuft bei Verdünnungsstufen von 1:100 bis 1:4 fast linear. Bei höheren Extraktkonzentrationen flacht sie ab, und es ergibt sich das Bild einer Sättigungskurve (Abb.46). Hieraus folgt, daß zur Bestimmung der extremen Fermentaktivitäten nach Ultraschall höhere Substratmengen erforderlich sind. Demnach war die von uns verwendete Substratkonzentration von 0.05 % DNS für die Messung der Versuchsergebnisse ausreichend.

In einem identischen Versuch wurden verschiedene Verdünnungen des Ultraschallextraktes (1:1 1:2 1:10) und unterschiedliche DNS-Konzentrationen (1.5 1.0 0.5 0.25 µg/ml) inkubiert. Bei 1.5 µg/ml kommt es (Abb.46) zu einem fast linearen Anstieg der Extinktion mit der Konzentration des Ultraschallextraktes. Die Gesamtaktivität entspricht dem 200-fachen der freien Aktivität nach isotoner Vorbehandlung und dem 10-fachen der freien Aktivität nach hypotoner Vorbehandlung. Im Gegensatz hierzu liegen die niedrigen Aktivitäten bei den im folgenden dargestellten Infektionsversuchen noch im linearen Bereich der Kurve. Die Substratkonzentration von 0.5 µg/ml DNS reicht hierfür aus.

III. Zunahme der freien lysosomalen Aktivität bei vollständigem Ablauf des Poliomyelitisvirus-Reproduktionszyklus

IIIA. Vergleich der lysosomalen sauren DNase nach Polioinfektion mit der freien und der Gesamtaktivität

Die ersten Versuche dieser Serie sollten feststellen, ob die lysosomalen Enzyme nach Polioinfektion vermehrt freigesetzt werden. Es wurden nur späte Termine (5 h und 7 h) untersucht. Die freie und die Gesamtaktivität wurden dabei als Referenzwerte mitbestimmt. Eine polioinduzierte vermehrte Freisetzung mußte sich als Erhöhung der freien Aktivität zeigen. Gleichzeitig war von Interesse, aus der Differenz von Gesamtaktivität und polioinduzierter Aktivität ein Maß für die noch partikelgebundene Aktivität zu erhalten.

Je 3 ROUX-Flaschen (= 2 x 10^8 Zellen) mit HEp-2 Zellen wurden mit Poliovirus Typ 1 Stamm LAHCNEY (MPI = 100 PFU/Zelle) inokuliert (Serie P). Zwei gleichgroße Zellchargen wurden gleichzeitig phantominokuliert (Serie K und U). Nach 30 min wurde das Inokulum entfernt und durch frisches Nährmedium ersetzt. Die nicht partikelgebundene saure DNase wurde nach 5 Stunden in den drei Zellchargen bestimmt. Dabei wurden die Zellen der Serien K und P mit dem DOUNCE-Homogenisator zerstört. Die Zellen der Serie U wurden durch Ultraschall homogenisiert; die U-Werte geben über die Gesamtaktivität Auskunft.

Abb. 45 zeigt einen deutlichen Anstieg der nicht partikulären sauren DNase im Grundplasma polioinfizierter Zellen. Setzt man K = 100 %, so beträgt P = 280 %, also eine Steigerung um etwa den Faktor 3. Die Gesamtaktivität (Serie U) beträgt etwa das 10-fache von K (940 % gegenüber 100 %). Die Werte für die freie Aktivität waren in diesem Versuch wegen der hypotonen Vorbehandlung höher als die in Abschnitt IIC genannten.

Die Enzymbestimmungen in infizierten (P) und nicht infizierten (K) Zellen wurden in 6 gleichartig aufgebauten Versuchen wiederholt und in einzelnen Fällen durch einen 7-Stunden-Termin ergänzt. Auch hier waren die Werte der Serie P in allen Versuchen um etwa 100 % höher als die Werte der Serie K. Diese Ergebnisse sind nach dem WILCOXON-test auf dem 1 % Niveau gesichert. Auch war in jedem Fall ein zusätzlicher Aktivitätsanstieg zwischen der 5. und der 7. Stunde festzustellen.

IIIB. Zeitlicher Verlauf der polioinduzierten Freisetzung lysosomaler Enzyme

Die nächsten Experimente sollten detailliertere Hinweise über Beginn und zeitlichen Verlauf der poliobedingten Freisetzung lysosomaler Enzyme geben. Das Ziel war, in einem durchgehenden Experiment die lysosomale freie Aktivität stündlich zu bestimmen. Wie das Schema 49 zeigt, ist die Durchführung eines derartigen Versuches recht kompliziert. Nur umfangreiche, exakte Voruntersuchungen machen die Planung und Durchführung möglich. Es werden große Zellenmengen benötigt (24 - 32 ROUX-Flaschen je Versuch), was nicht nur eine extreme Belastung der Gewebezucht ist, sondern vor allem zu zeitraubenden Manipulationen bei der Inokulation und dem Mediumwechsel führt. Da hierdurch Ungenauigkeiten im Versuchsablauf auftreten können, wurde der Reproduktionszyklus in zwei Etappen unterteilt. In einer Gruppe wurden die frühen Stadien von der 0. bis zur 4. Stunde untersucht, in einer weiteren Gruppe die Stadien von der 2. bis zur 7. Stunde.

Frühe Stadien

5 ROUX-Flaschen mit HEp-2 Zellen wurden zum Zeitpunkt 0 nach Schema 47 mit Poliovirus Typ 1 Stamm LAHONEY (MOI = 80 PFU/Zelle) inokuliert (Serie P). 5 weitere Flaschen wurden als Kontrollserie (K) phantominokuliert. Nach

30-minütiger Adsorption wurde das Medium gewechselt. Die Zellen wurden in stündlichen Intervallen aufgearbeitet und als Maß für die nicht partikulären lysosomalen Enzyme die saure DNase und Phosphatase bestimmt. Die Extinktionen der jeweiligen Kontrollkulturen wurden von denen der Versuchsserie (P) subtrahiert.

Abb. 48 zeigt das Verhalten der nichtpartikulären lysosomalen Enzyme während der ersten 5 Stunden der Polioinfektion. Die saure DNase bleibt bis zur 2. Stunde auf dem Kontrollniveau. Danach steigt ihre Aktivität zwischen der 2. und der 4. Stunde steil an. Die saure Phosphatase schwankt bis zur 4. Stunde um das Kontrollniveau und steigt dann in der aus Vorversuchen bekannten Weise an.

Späte Stadien

21 ROUX-Flaschen mit HEp-2 Zellen wurden entsprechend dem Versuchsplan 49 (Teil II) mit Poliovirus Typ 1 Stamm MAHONEY (MPI = 80 KBE/Zelle) inokuliert (Serie P). 3 weitere ROUX-Flaschen wurden phantominokuliert und dienten als Kontrollen (Serie K). Stündlich (Schema 49) wurden drei ROUX-Flaschen entsprechend der allgemeinen Methodik aufgearbeitet und die nicht partikulären lysosomalen Aktivitäten der Testenzyme bestimmt. Die für die Kontrolle erhaltene Extinktion wurde als 100 % gesetzt und die anderen Termine darauf bezogen.

Abb. 50 zeigt den Anstieg der sauren Phosphatase von der 4. bis zur 7. Stunde nach der Inokulation. Die saure DNase weist einen starken Anstieg zwischen der 2. und der 7. Stunde auf. Die Untersuchungstermine 0 und 1 waren nicht auswertbar. Das Ergebnis konnte in einem weiteren gleichartig angelegten Experiment qualitativ reproduziert werden.

IV. Fehlen freier lysosomaler Aktivität nach Hemmung des Poliomyelitisvirus-Reproduktionszyklus durch Guanidin

Wie bei den Chromosomenuntersuchungen wurde auch bei der Untersuchung der lysosomalen Enzyme der vollständige Poliomyelitisvirus-Reproduktionszyklus der unvollständigen, durch Guadinin gehemmten Reproduktion gegenübergestellt. Guanidin hemmt die Polymerisation der Poliovirus-RNS (EGGERS und TAMM, 1963; BABLANIAN, EGGERS und TAMM, 1965). Frühe Stadien der Reproduktion finden noch statt; doch kommt es nach Applikation von 250 µg/ml Guanidin (NBCo) zu einer Verminderung der Ausbeute an reifem Virus um 5 log 10 (HABERMEHL, 1966b), und selbst 24 Stunden nach der Inokulation ist kein CPE zu beobachten (HABERMEHL et al., 1969). In zwei Versuchen wurde geprüft, ob die freie lysosomale Aktivität unter diesen Bedingungen erhöht ist.

Je Termin und Zellcharge wurden 3 ROUX-Flaschen mit HEp-2 Zellen verarbeitet. Der Versuchsansatz ist im Schema auf Seite 36 wiedergegeben. Die Zellen der Serie PG wurden zum Zeitpunkt 0 mit Poliovirus Typ 1 Stamm MAHONEY (MPI = 2 x 10^2 PFU/Zelle) inokuliert; dem Inokulum wurden 250 µg/ml Guanidin NBCo zugesetzt. Die Untersuchung erfolgte zur 7. und 14. Stunde nach der Inokulation. Nach 30 min Adsorption wurde das Inokulum abgesaugt und durch frisches Guanidinmedium ersetzt (vgl. S. 17 + 36). Zu dieser Versuchsserie (PG) wurden drei Kontrollen angefertigt: Serie P, ebenfalls mit 2 x 10^2 PFU/Zelle MAHONEY inokuliert, aber ohne den Inhibitor; Serie G, nicht infiziert, jedoch mit Inhibitorzusatz in der gleichen Konzentration wie in PG; Serie K, weder infiziert noch mit Guanidin behandelt. Die lysosomalen Testenzyme wurden an den Untersuchungsterminen nach der oben beschriebenen Methode bestimmt.

Vergleicht man K und P des 7-Stunden-Termines (Abb.51), so erkennt man den bereits beschriebenen polioinduzierten Anstieg der freien lysosomalen Aktivität. Man sieht weiterhin (Serie PG), daß nach Hemmung der Polioreproduktion durch Guanidin der Anstieg der sauren DNase ausbleibt. Die

Aktivitäten der Serien PG und G sind sogar niedriger als in den Kontrollen. Die Werte der sauren Phosphatase wiesen wie in allen Versuchen größere Schwankungen auf. Jedoch war auch in diesem Falle zu erkennen, daß die enzymatische Aktivität nach Polioinfektion ansteigt, und dieser Anstieg nach Hemmung der Reproduktion durch Guanidin ausbleibt.

Von besonderem Interesse waren die Enzymbestimmungen zur 14. Stunde nach der Inokulation, da die Chromosomenbefunde (Tab.6) ebenfalls von diesem Termin stammen. Der Vergleich von K mit G und PG zeigt, daß auch zur 14. Stunde nach Infektionsbeginn die Aktivitätszunahme der sauren DNase durch Guanidinbehandlung verhindert wird. Sie beträgt sogar nur 60 % der Kontrollwerte. Der zur 5. Stunde nach der Inokulation beginnende Polio-CPE zerstört die infizierten Zellen vollständig. So konnte die Serie P nicht mehr 14 Stunden nach der Inokulation untersucht werden (vgl. S. 77).

V. Ergebnisse

Die Teile I und II befaßten sich mit der Ursache der schweren diffusen Chromosomenveränderungen. Diese traten im Verlauf eines vollständigen Poliomyelitisvirus-Reproduktionszyklus in den infizierten Zellen auf, fehlten aber im Falle der guanidingehemmten, unvollständigen Reproduktion. Andere Typen der Chromosomenschädigung, nämlich Chromatidbrüche und c-Anaphasen, treten in diesem PG-System ebenso vermehrt auf wie bei der vollständigen Virusreproduktion.

Es besteht eine enge Korrelation zwischen dem Auftreten der diffusen Schäden und der Erhöhung lysosomaler enzymatischer Aktivität im Grundplasma der infizierten Zellen. Beide Erscheinungen sind nur im vollständigen und nicht im guanidingehemmten Reproduktionszyklus anzutreffen.

T e i l III

Der Einfluß von Enzymen auf die Struktur der Metaphasechromosomen

I. Einführung

Die Befunde der Teile I und II führten zu der Hypothese, daß schwere diffuse Chromosomenveränderungen durch Einwirkung lysosomaler Enzyme entstehen. In den Experimenten des Teiles III wurde eine Reihe, den lysosomalen Enzymen nahestehender Hydrolasen Metaphasechromosomen appliziert. Das Ziel der Modelluntersuchungen war, die durch das Poliovirus ausgelösten Chromosomenveränderungen möglichst weitgehend zu reproduzieren.

Außerdem wurden Zellextrakte mit hohen Aktivitäten freier lysosomaler Hydrolasen in gleicher Weise untersucht.

Die Lysosomen (DE DUVE et al., 1953; APPELMANS et al., 1955; NOVIKOFF, 1961; KOMNICK und WOHLFARTH-BOTTERMANN, 1966; KRISCH, 1966) enthalten Hydrolasen, deren pH-Optimum im sauren Bereich (pH 5) liegt. Für eine Chromosomenschädigung kommen Proteasen und Nukleasen in Betracht. Es wurde die Wirkung der proteolytischen Enzyme: Trypsin, Papain, Pronase und Collagenase, sowie die Wirkung der Nukleasen: neutrale und saure DNase und neutrale RNase, getestet.

Es war anzunehmen, daß fixierte, luftgetrocknete Chromosomen (vgl. S.8) eine andere Enzymempfindlichkeit als Chromosomen in vivo besitzen (vgl. DICK et al., 1968). So wurden alle Untersuchungen sowohl an fixierten Metaphaseplatten als auch an nativen, in Suspension befindlichen, isolierten Metaphasechromosomen durchgeführt.

II. Material und Methodik

IIA. Untersuchte Enzyme (vgl. Tab.10)

IIA1. Trypsin 1:300 der Fa. Nutritional Biochemicals, Cleveland, Ohio wurde bei pH 7.2 in PBS (siehe S.6) gelöst.

IIA2. Papain (Fa. SCHUCHARDT, München. I.U.B.-Nr. 3.4.4.10, MG 21.000, aus Papaya latex, 2 x kristallisiert, Suspension in 0.05 M Natriumacetatlösung, pH 4.5; - Aktivität etwa 10 E pro mg Protein)

ist von außergewöhnlicher Stabilität gegen hohe Temperaturen und pH-Änderungen. Im Unterschied zu Trypsin, das Eiweiße nur bis zu Polypeptiden abbauen kann, ist Papain in der Lage, Proteine bis zu freien Aminosäuren zu spalten.

Papain enthält pro Molekül 1 oder 2 Thiolgruppen (-SH) und ist nur aktiv, wenn diese in ihrer reduzierten Form erhalten bleiben. Oxydierende Substanzen hemmen die proteolytische Wirksamkeit, während Stoffe, welche Disulfidbindungen reduzieren können, die Aktivität steigern (z.B. HCN, H_2S, Cystein, Glutathion). Aufgrund der Aktivität der SH-Gruppen gegenüber Schwermetallionen können Schwermetallspuren die Aktivität des Papains herabsetzen. Zusätze von schwermetallbindenen Stoffen (z.B. Titriplex II = EDTA = Äthylendiamintetraessigsäure) wirken deswegen stabilisierend.

Die Verdünnungsreihen der Ausgangslösung wurden sowohl in isotonem Acetatpuffer pH 5.0 als auch in dem gleichen Puffer (oder Phosphatpuffer) nach Zugabe von EDTA und Cystein ausgeführt.

Papain-Puffer, pH 3.65

100 ml m/15 Phosphatpuffer, pH 5.0
+ 0,812 g NaCl (MERCK, p.a.)
+ 1,76 mg Cystein (NBCo, MG 176) = 10^{-3} M
+ 37,2 g EDTA (MERCK, MG 373) = 10^{-3} M

Phosphatpuffer: 1.1876 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ + 100 ml Aq.bidest.
0.9078 g KH_2PO_4 + 100 ml Aq.bidest.
1 ml sekundäres Phosphat + 99 ml primäres Phosphat

Isotoner Acetatpuffer, pH 5.0

1.36 g Natriumacetat + $3H_2O$ (MERCK, p.a.)
+ 27,0 ml 0.1 n Essigsäure (MERCK, p.a.)
+ 8,12 g NaCl (MERCK, p.a.)
Aq.bidest. ad 100 ml

IIA3. Pronase der Fa. SERVA, Heidelberg (lyophilisiert, reinst, aus Streptomyces griseus) wurde in isotonem Acetatpuffer, pH 5.0 angewendet.

IIA4. Collagenase der Fa. SERVA (I.U.B.-Nr. 3.4.4.19 aus Clostridium histolyticum, lyophilisiert, rein, 150 EU/mg) wurde in isotonem Acetatpuffer bei pH 5.0 angewendet.

IIA5. Neutrale DNase der Fa. SERVA (I.U.B.-Nr. 3.1.4.5., lyophilisiert, rein, aus Rinderpankreas; - etwa 30.000 Dornase E / mg) wurde in PBS gelöst.

Abb. 52 zeigt eine Eichkurve der verwendeten neutralen DNase mit Kalbsthymus-DNS als Substrat.

Die Eichkurve wurde auf folgende Weise gewonnen:

DNS-Lösung: 5 mg Kalbsthymus-DNS (SERVA) über Nacht in 1 ml Aq.bidest. vorquellen lassen, 9 ml isotone PBS langsam unter häufigem Schütteln tropfenweise zugeben, um eine gute Lösung der DNS zu erreichen.

Je Ansatz wurden 1.38 ml der DNS-Stammlösung mit 0.5 ml der einzelnen DNaseverdünnungen 2 Stunden lang bei 37° C inkubiert. Nach der Inkubation wurde als Fällungsmittel jeweils 1.75 ml 0.25 % Uranylacetat (MERCK, p.a.) in 4 % Perchlorsäure (MERCK, p.a.) zugegeben und die enzymatische Reaktion durch Fällung der Proteine sowie der hochmolekularen DNS in der Kälte unterbrochen. Das Präzipitat wurde in der Ultrazentrifuge durch 20 min Zentrifugation bei 12.000 xg entfernt (+ 4° C) und der Überstand 1 : 10 mit Aq.bidest. verdünnt. Anschließend wurden die Extinktionen bei 260 mμ gegen Aq.bidest. gemessen (ZEISS, PMQ II).

IIA6. Saure DNase der Fa. SCHUCHARDT (I.U.B.-Nr. 3.1.4.6., aus Rindermilz, lyophilisiert, salzfrei; - Aktivität etwa 300 E / mg) wurde in isotonem Acetatpuffer pH 5.0 gelöst.

Die Abb. 52 zeigt Eichkurven dieser DNase mit Kalbsthymus-DN (SERVA) als Substrat.

Die Eichkurven für die saure DNase wurden wie die für die neutrale DNase gewonnen. In Abb. 52 werden die Kurvenver-

läufe für die beiden Enzyme vergleichend dargestellt. Im Falle der Abb. 39, 40 ist die Enzymreaktion mit (gestrichelte Linien) und ohne (ausgezogene Linien) $MgCl_2$ (vgl. S.44) untersucht worden.

Zur Kontrolle der Messung wurde bei einer Konzentration von 250 µg/ml saurer DNase die Extinktion bei verschiedenen Wellenlängen (zwischen 220 und 300 m µ) gemessen.

IIA7. Saure Phosphatase der Fa. SCHUCHARDT (I.U.B.-Nr. 3.1.3.2, aus Kartoffeln, gereinigt, lyophilisiert, Akt.-Einheiten 2 pro mg Protein, Substrat: p-Nitrophenylphosphat bei 37° C und pH 4.8) wurde in isotonem Acetatpuffer pH 5.0 gelöst.

Abb. 53 zeigt eine Eichkurve dieses Enzyms, die mit dem BOEHRINGER-Test erhalten wurde.

IIA8. Muramidase = Lysozym der Fa. SCHUCHARDT (I.U.B.-Nr. 3.2.1.17 MG 14400, aus Eiklar, 1 x kristallisiert, lyophilisiert, dialysiert - aktive Einheiten etwa 10.000 / mg) wurde in isotonem Acetatpuffer pH 5.0 gelöst.

IIA9. Neutrale RNase der Fa. NBCo (5 x umkristallisiert) wurde in isotoner PBS gelöst.

IIB. Einwirkungsdauer und Inkubationstemperatur

Für die Enzymuntersuchungen wurden ausschließlich HEp-2 Zellen (vgl. S.5-6) verwendet. Die Einwirkungsdauer der Enzyme betrug 30 min (Tab.10), die Inkubationstemperatur war 37° C.

Für jeden Versuch wurden zwei Kontrollen hergestellt: unbehandelte Präparate und Präparate, die mit dem jeweiligen Puffer behandelt wurden, in dem das Enzym verdünnt worden war.

Die ungefärbten, fixierten und luftgetrockneten Zellen wurden vor der Enzymeinwirkung mit dem Phasenkontrastmikroskop geprüft. Auf der Unterseite des Objektträgers, etwa in der Mitte des Präparates wurde mit einem Glasschreiber ein

kreisförmiges Areal markiert, das ausreichend gut gespreitete c-Metaphasen enthielt.

Je Verdünnungsstufe wurden zwei Tropfen der Enzymlösung aufgegeben und so verteilt, daß innerhalb des markierten Bereiches alle Zellen von einer dicken Flüssigkeitsschicht bedeckt waren. Die Inkubation wurde in einem luftdicht verschlossenen Brutgefäß vorgenommen, das in einer begehbaren (37° C-) Brutkammer aufgestellt war. Der Boden des Brutgefäßes wurde reichlich mit Aq.dest. bedeckt, um ein Austrocknen der Enzymlösung zu verhindern (feuchte Kammer). Die Objektträger wurden schon vor Versuchsbeginn in den Kammern aufgebaut, um Temperaturangleichung zu erzielen.

Nach der Inkubation wurden die Objektträger rasch in Aq. dest. und im jeweiligen Puffer gespült. Die Enzymreaktion wurde durch saure Hydrolyse (1 n HCl, 60° C, 6 min) unterbrochen, die Chromosomen wurden wie in Teil I (S. 8-12) gefärbt.

Die nach IIC isolierten Metaphasechromosomen wurden direkt in der Enzymlösung resuspendiert. Hierdurch erfolgte eine Verdünnung der Enzymlösungen um den Faktor 2.

IIC. Isolierung von Metaphasechromosomen

C-Metaphasechromosomen wurden entsprechend der Methode von SALZMAN et al. (1966) und MAIO et al. (1966) aus HEp-2 Zellen (vgl. S. 6 und Abb. 3,4) isoliert (Abb.54).

Im Prinzip wurde so verfahren, daß zunächst die Metaphasen durch langzeitige Colchizineinwirkung angereichert werden. Danach wurden trypsinierte Zellen einem hypotonen Schock unterworfen und ein Auseinanderrücken der Chromosomen herbeigeführt. Sodann wurden die Zellen im DOUNCE-Homogenisator

zerstört, wobei das Pistill so gewählt war, daß Chromosomen und Ruhekerne nicht zerbrachen. Eine Zentrifugation trennte die Ruhekerne von den Metaphasechromosomen und den Zelltrümmern ab. Eine Dichtegradientenzentrifugation trennte die Chromosomen von verunreinigenden Zelltrümmern und feinem Zelldebris.

Im einzelnen gliederte sich das Isolierungsschema wie folgt:

1. Arretierung der Metaphasen durch 0.05 µg/ml Colchizin für 13 Stunden (meist wurde von etwa 2×10^8 Zellen ausgegangen)

2. Trypsinieren der Zellen, überführen der Suspension in eine Vorlage von eiskaltem Kälberserum, abzentrifugieren der Zellen bei 800 xg für 5 min, verwerfen des Überstandes

3. 2 x waschen in je 50 ml warmer, isotoner PBS, abzentrifugieren der Zellen bei jeweils 800 xg für 5 min, Überstand verwerfen

4. Hypotoner Schock: in 0.7 % Natriumcitrat + 5 H_2O bei 37° C 20 min lang im Wasserbad

5. Abzentrifugieren bei 800 xg / 5 min, Überstand verwerfen, Zellsediment resuspendieren in ZST-Puffer (s.u.)

6. Homogenisieren der Zellen im DOUNCE-Homogenisator (Pistill A) 40 Schläge

7. Zentrifugieren 5 min bei 500 xg, Sediment verwerfen, mit dem Überstand einen kontinuierlichen Sucrosegradienten (s.u.) überschichten

8. Gradientenzentrifugation bei 800 xg 30 min lang, anstechen der Zentrifugenröhrchen, abtropfen des Gradienten, sammeln von etwa 20 Fraktionen (je 2 ROUX-Flaschen), prüfen der Fraktionen unter dem Phasenkontrastmikroskop

9. Sammeln und resuspendieren der Fraktionen, die eine saubere Suspension von Metaphasechromosomen zeigen

10. Abzentrifugieren der Chromosomen bei 10.000 xg 30 min lang, Überstand verwerfen, Sediment resuspendieren in ZST-Puffer

Herstellung von Ausstrichpräparaten

a) Chromosomensuspension (in ZST-Puffer) gut resuspendieren und anschließend je Objektträger 0.1 ml vorsichtig (Chromosomen dürfen nicht mechanisch beschädigt werden!) ausstreichen

b) Lufttrocknen

c) Fixieren (Methanol + Eisessig, 3 + 1)

d) Trocknen

e) Hydrolyse

f) Färbung

ZST - Puffer = Zitronensäure-Sucrose-TWEEN, pH 2.5

0.1 ml TWEEN 80 (NBCo)
+ 3,42 g Sucrose (LANN, Res.Lab., N.Y., "special enzyme grade")
+ 2,5 g Zitronensäure (MERCK, p.a.)
Aq.bidest. ad 100 ml

Kontinuierlicher Sucrosegradient

Je 0.5 ml von 6 Verdünnungsstufen einer Sucroselösung wurden in einem Zentrifugenröhrchen vorsichtig überschichtet und zum Ausgleich der Konzentrationsstufen über Nacht bei + 4° C erschütterungsfrei aufbewahrt: 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % und 5 %.

Die Aufgabe erfolgte in Röhrchen aus Zellulosenitrat mit einem Durchmesser von 13 mm und einer Länge von 55 mm.

III. Strukturveränderungen der Chromosomen durch proteolytische Enzyme

IIIA. Trypsin

Bei einer Konzentration von 10 - 50 µg / ml Trypsin (pH 7.0) konnten die ersten Veränderungen am Metaphasechromosom bemerkt werden. Das galt sowohl für fixierte als auch für native Chromosomen, obwohl die Wirkung auf native Chromosomen etwas ausgeprägter erschien.

Die Chromosomen behalten zunächst (10-50 µg/ml) ihre c-Metaphasestruktur bei. Sie sind jedoch nicht mehr scharf konturiert und etwas verdickt. Die Färbung (Orcein. GIEMSA) ist schwach und ungleichmäßig. Im Phasenkontrastmikroskop stellen sich Bereiche unterschiedlicher Dichte dar. Die verbleibende Substanz verläuft und bildet unregelmäßige Areale, die z.T. verklumpen, wobei es zu Fadenbildungen kommen kann.

Bei etwa 100 µg/ml sieht man, daß die basischen Proteine in zunehmendem Maße herausgelöst werden und die Chromosomen als leuchtender grünlicher Saum umgeben. Nach der Fastgreenfärbung von ALFERT und GESCHWIND (1953) ohne vorangegangene Hydrolyse handelt es sich hierbei um die Histone. Das übrigbleibende Chromatin fließt zu tropfenförmigen Gebilden zusammen, die durch feine, FEULGEN-positive Fäden verbunden sind. Die typische c-Metaphasestruktur geht hierbei weitgehend verloren; gleichzeitig verbreitern sich die Chromosomen. Durch die starke räumliche Ausdehnung berühren sich die Schwesterchromatiden und sind kaum noch voneinander zu unterscheiden (Abb.55). Als differenzierbare Punkte bleiben die Centromerregion und die Telomerregion noch lange erkennbar.

An Hand des morphologischen Bildes können hierfür sowohl Quellungszustände, ein Zerfließen des Materials, als auch Verschmelzungen und Verklebungen chromosomaler Bestandteile in Betracht kommen.

Die Ruhekerne sind zunächst noch intakt, die Nukleolen sind vergrößert und treten deutlicher hervor.

Bei 400 µg / ml Trypsin verlaufen die Chromosomen in große, undifferenzierbare Areale (Abb.56) (GIEMSA-Färbung). Mitunter verbleibende fädchenförmige Restprodukte zeigen das Bild einer Perlschnur.

Auch die Ruhekerne werden stark angegriffen. Die Kernsubstanz ist deutlich vermindert. Im Bereich der Kernmembran finden sich Reste anfärbbaren Materials. Aufgrund der vorliegenden Beobachtungen kann nicht entschieden werden, ob es sich um Chromatin handelt, das an die Membran angelagert ist (COMINGS, 1968), oder um unregelmäßige Verdichtungen der Kernmembran (Abb.57,58,59).

Bei 700 µg / ml Trypsin ist von den Ruhekernen lediglich ein äußerer Ring von Körnchen übriggeblieben, dessen Zentrum leer erscheint. Oft sind die Ringe zerrissen, und perlschnurartige Fibrillen durchziehen gestrüppartig die Umgebung der Kernreste (Abb.60).

Bei hohen Konzentrationen kann man Ruhekerne und geschädigte Metaphaseplatten kaum noch unterscheiden. Schließlich sind auch die Interphasekerne bei 1000 µg / ml Trypsin nur noch selten auffindbar und identifizierbar. Sie stellen sich als einzelne, körnige, auch mit GIEMSA ungefärbte Areale dar. Nur ganz vereinzelt können stark enzymatisch geschädigte Metaphaseplatten aufgefunden werden. Die Chromosomen erscheinen, sofern sie einzeln liegen, als ein Quadrat oder Rechteck (Abb.61), das von einer gepunkteten Linie umgeben

wird. Lichtgrün gefärbte Präparate zeigen die gleichen ungefärbten Strukturen, so daß man annehmen muß, daß bei diesen Konzentrationen die Histone und Protamine völlig abgebaut sind und DNS-Fibrillen sowie "residual proteins" übrigbleiben (vgl. MACKAY, HILGARTNER, DOUNCE, 1968; HILGARTNER, 1968).

IIIB. Papain

Unter den von uns untersuchten Proteasen zeigt das durch Cystein aktivierte Papain (pH 5.0) die stärkste proteolytische Wirkung auf Chromosomen. Bereits bei 0.1 µg / ml war eine starke Schädigung zu erkennen. Geringere Konzentrationen wurden nicht untersucht.

Die Chromosomenreste zeigen bei Orceinfärbung lediglich breitflächige Areale mit feinkörniger Struktur. Ihre Randzonen sind stärker gefärbt als das Innere. Oft wird ein Chromosom nur von einer Linie punktförmiger Verdichtungen begrenzt. Diese feinen Granula können auch zwischen den Chromosomenresten angefunden werden (Abb.62-67).

Die Ruhekerne (Abb.68,69) werden von einer dicken, eingekerbten, stark angefärbten Membran umgeben, die häufig büschelförmige, fibrilläre Ausläufer aufweist. Bei höheren Konzentrationen gleichen die Schädigungsbilder immer mehr denen, die bei Pronaseeinwirkung (IIIC) zu beobachten waren. Dies gilt gleichermaßen für Ruhekerne und Chromosomen. Oberhalb 100 µg / ml sind auch bei nicht inaktiviertem Papain keine Kernreste mehr zu finden.

IIIC. Pronase

Bereits 5 µg / ml Pronase zeigen einen deutlichen Effekt auf fixierte Metaphasechromosomen. Die Chromosomen erschei-

nen zunächst ähnlich wie bei Trypsineinwirkung etwas verdickt und unscharf konturiert (Abb.70); dabei ist ihre c-Metaphasestruktur nicht verändert. Die Färbbarkeit nimmt ab, wobei die Darstellung des Chromatins (Orcein) von der Achse der Chromatiden her an Intensität verliert. Liegen Chromosomen nahe beieinander, so laufen die schwach gefärbten Zonen ineinander über.

Bei 10 µg / ml Pronase zeigen viele Chromatiden und einige Ruhekerne unregelmäßige Randbegrenzungen und feine, zipfelförmige Ausziehungen (Abb.71,72,73). Im Gegensatz zu der Trypsineinwirkung findet sich ein dichtes Netz feiner Fasern, das von der Oberfläche der Chromosomen und der Ruhekerne ausgeht (Abb.73,75,76). Es erscheinen spiralige Subchromatiden (Abb.71) und die Telomere sind meist zweizipfelig aufgefasert (Abb.71) (vgl. HUBERMAN et al., 1968).

Bei 50 µg / ml sieht die Pronasewirkung derjenigen des Trypsins sehr ähnlich: Breitflächige Areale der Chromosomenreste sind durch zahlreiche Fädchen verbunden. Bei dieser Konzentration sind auch die Ruhekernmembranen zerrissen, und ein Gestrüpp von Fibrillen erstreckt sich in die Umgebung der Interphasekerne. Im Gegensatz zu den bei Trypsin beobachteten Bildern mit tropfenförmigen Verklumpungen herrschen bei der Pronase strahlenförmige, feine Ausläufer vor, die sich zwischen den einzelnen Chromosomen immer stärker vernetzen. Dadurch sind auch bei diesem Enzym die einzelnen Chromosomen schließlich nicht mehr eindeutig voneinander abgrenzbar.

Metaphaseplatten sind bei 100 µg / ml Pronase kaum noch zu finden; die Ruhekerne sind weitgehend zerstört, wobei zum Gegensatz zum Trypsin zunächst die Peripherie angegriffen wird (Abb.75,76).

Bei 500 ug / ml Pronase findet man nur gelegentlich schwach angedeutete Fetzen von Interphasekernen.

IIID. Collagenase

Die Wirkung der Collagenase (pH 5) auf Chromosomen ist ab 100 µg / ml sichtbar. Damit hat dieses Enzym die geringste Wirksamkeit unter den von uns untersuchten Proteasen. Es muß allerdings berücksicht werden, daß die Collagenase nicht bei optimalem pH (7.4) sondern im sauren Milieu getestet wurde.

Wie bei allen untersuchten proteolytischen Enzymen erscheinen zunächst die Chromosomenränder unscharf begrenzt (Abb. 77,78). Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Enzymen sind die Chromatiden etwas dünner, in ihrer Struktur deutlich aufgelockert und von zahlreichen kleinen Vakuolen durchsetzt (Abb.79,80), die nicht immer einwandfrei von den aufgelockerten Bezirken abzugrenzen sind. In der unmittelbaren Umgebung der Chromosomenreste findet sich eine homogene, schwach gefärbte Substanz, die vornehmlich zwischen den Schwesterchromatiden lokalisiert ist.

Mit zunehmender Konzentration (bis zu 1000 µg/ml) erodieren die Chromosomen stärker, bilden feine fädige Ausläufer, behalten aber im Gegensatz zu den anderen Proteasebehandlungen ihre schmale Form weitgehend bei.

IV. Wirkung von DNase auf Metaphasechromosomen

Die Wirkungen von saurer und neutraler DNase auf die lichtmikroskopisch erfaßbare Struktur der Metaphasechromosomen sind vollkommen voneinander verschieden. Während die saure DNase (DNase II, 3'-Monoester-Former, Inhibitoren z.B.: Mg^{++}) bei den von uns verwendeten Konzentrationen (maximal 40 µg/ml) und auch bis zu 500 µg/ml (HABERMEHL, persönliche Mitteilung) keine Wirkung auf Metaphasechromosomen zeigt, finden wir bei der neutralen DNase (DNase I, 5'-Monoester-

Former, Enzymreaktion wird durch Mg^{++} begünstigt) den weiter unten eingehend beschriebenen deutlichen Effekt. Nach den Untersuchungen von BERNARDI (1966) und LASKOWSKI (1963) unterscheiden sich die beiden Enzyme nicht nur durch eine unterschiedliche Zuordnung zu bestimmten Geweben (DNase I = Niere, Pankreas, DNase II = Thymus, Milz). Sie besitzen verschiedene optimale pH-Werte, spezifische aktivierende und hemmende Substanzen und spezifische Abhängigkeiten von bestimmten Ionen.

Die beiden Enzyme haben außerden weder die gleiche Enzymkinetik noch die gleichen Endprodukte. So führt die Reaktion der DNase II (3'-Monoester-Former) zur Bildung von wesentlich mehr "höheren-Oligonucleotiden", mehr Mononucleotiden aber weniger Dinucleotiden als DNase I (5'-Monoester-Former) (vgl. die Eichkurven in Abb.52).

Die neutrale DNase vermindert die Färbbarkeit der Chromosomen mit FEULGEN, GIEMSA und Orcein (Abb.82,83,84). Die niedrigste Konzentration, die eine Veränderung der Chromosomen erkennen ließ, betrug etwa 0.1 µg/ml (vgl. Tab.10). Dabei blieb die typische c-Metaphasestruktur der Chromosomen erhalten, sie waren nur schwach gefärbt. Die Ränder waren besonders betroffen. Die Färbbarkeit nimmt mit steigender Konzentration weiter ab, und oberhalb von 20 µg/ml waren die Chromosomen im Hellfeld kaum noch sichtbar. Im Phasenkontrastmikroskop konnte man bei hohen Konzentrationen nur noch veschwommene Tupfen beobachten., wobei es sich um Ruhekerne oder schwach ausgebreitete Metaphasen handelte. Bei maximaler Konzentration waren nach GIEMSA-Färbung auch im Phasenkontrastmikroskop keine Ruhekerne mehr auffindbar.

Mit der Lichtgrünfärbung stellt sich die DNase-Wirkung folgendermaßen dar. Bei 10-20 µg/ml werden die Chromosomen etwas brüchig, bröckelig oder körnig. Ihre Konturen wirken verschwommen. Die Randzonen der Chromosomen sind stärker gefärbt als ein von ihnen eingeschlossener, zentraler Zylinder.

Diese Befunde zeigen, daß in erster Näherung die Proteine (Histone) und nicht die DNS für die Struktur der Metaphasechromosomen maßgebend sind. Das ist umso erklärlicher, als der Proteinanteil der Chromosomen übereinstimmend mit etwa 70 % (CANTOR et al., 1966; SALZMAN et al., 1966; MAIO et al., 1966) der Anteil der DNS mit etwa 15 % angegeben wird. Unsere Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit KRONE et al. (1965). Allerdings konnten wir die von KRONE beschriebenen "leeren Hüllen" nach DNasewirkung nicht beobachten und nehmen an, daß es sich um ein Artefakt der Phasenkontrastbeobachtung handelt ("optische Phasengrenzen" nach BEERMANN, 1962), zumal die Abbildungen der genannten Publikation unserer Ansicht nach bei Trypsinbehandlung ebenfalls leere Hüllen zeigen. Auch in unseren Präparaten wurden derartige Artefakte bei stark überfärbten (Orcein) Präparaten und bei Proteaseeinwirkung beobachtet (siehe Abb.65,72,73).

Vergleicht man die DNase behandelten Metaphasen mit den diffusen Chromosomenveränderungen, die durch das Poliovirus induziert werden, so ergibt sich ein wesentlicher Unterschied. Die diffusen Chromosomen sind mit Orcein und GIEMSA gut färbbar und erweisen sich als FEULGEN-positiv (vgl. S. 22). Die typische Struktur der c-Metaphasechromosomen ist bei ihnen aber nicht mehr vorhanden. Umgekehrt haben die DNase behandelten Chromosomen eine weitgehend intakte Struktur bei Verlust der Färbbarkeit; sie sind FEULGEN-negativ. Hinzu kommt, daß lysosomale, saure DNase keine Wirkung auf Metaphasechromosomen hat.

Vergleichende Untersuchungen mit DNasen an nativen fixierten Chromosomen zeigten keine Unterschiede in der Enzymsensibilität.

V. Einwirkung von RNase auf Metaphasechromosomen

Selbst hohe RNase-Konzentrationen konnten die Metaphasechromosomen in ihrer Gestalt nicht verändern (250 µg/ml, 30 min, pH 7.2). Auch die Färbbarkeit der Chromosomen nach GIEMSA war unvermindert. Nach MAIO et al. (1966) sowie SALZMAN et al. (1966) bestehen die Metaphasechromosomen zu 11-14 % aus RNS. MAIO et al. weisen nach, daß der größte Teil dieser RNS aus Ribosomen besteht, die während der Präparation an die Chromosomen adsorbiert wurden. Danach ist verständlich, daß ein Abbau der chromosomalen RNS-Fraktion zu keiner mikroskopisch sichtbaren Veränderung führt. Diese RNS-Bestandteile dürften für die Struktur der Chromosomen unerheblich sein. KRONE et al. (1965) kamen zu vergleichbaren Ergebnissen.

Eine andere Erklärungsmöglichkeit der negativen Ergebnisse mit RNase bieten die Untersuchungen von HUANG (1969) sowie BECKHOR et al. (1969). Danach liegt die chromosomale RNS vermutlich als durch Wasserstoffbrücken an die DNS gebundene Doppelstrangform vor und ist deswegen RNase resistent.

VI. Einwirkung von saurer Phosphatase oder Muramidase auf Metaphasechromosomen

Wie zu erwarten hatten weder saure Phosphatase noch Muramidase irgendeine mikroskopisch erkennbare Wirkung auf fixierte oder native Metaphasechromosomen. Da die verwendete Phosphatase eine Monoesterase ist, kann sie die chromosomale DNS nicht spalten. Erst eine vorangegangene Behandlung mit DNase und Schlangengiftdiesterase würde ein geeignetes Substrat schaffen (vgl. HARBERS, 1964).

Für die Muramidase fehlt ein chromosomales Substrat (Mucopolysaccharide und Mucopolypeptide).

Die beiden Enzyme wurden in Konzentrationsbereichen von 5 µg/ml bis zu 2000 µg/ml bei pH 5.0 getestet.

VII. Wirkung der freien lysosomalen Enzyme auf Metaphasechromosomen

Nach den vorangegangenen Experimenten ist ein Zusammenhang zwischen den polioinduzierten schweren diffusen Chromosomenveränderungen und den freigesetzten proteolytischen lysosomalen Enzymen wahrscheinlich.

Ziel der Untersuchungen des Abschnittes VII war, Metaphasechromosomen mit dem Zellextrakt infizierter Zellen zu inkubieren, um die Wirkung der freien lysosomalen Enzyme zu testen. Die Methodik ist wie bei Teil II und III. Zehn in dieser Hinsicht durchgeführte Experimente zeigten ausnahmslos keine enzymatische Wirkung. Sowohl die nativen als auch die fixierten Metaphasechromosomen unterschieden sich nach Inkubation mit Zellextrakten nicht von den Kontrollpräparaten.

Dennoch ist die Beschreibung der einzelnen Versuche wichtig. Daß auch verschiedenartige Modifikationen der Versuchsbedingungen zu einem negativen Ergebnis führten, läßt auf das Vorhandensein eines komplexen Schutzmechanismus schließen. Dies führt zu der Frage, ob das lysosomale Konzept auf durch Viren verursachte Chromosomenschäden angewendet werden darf.

Versuch I

Aus den vorangegangenen Versuchen war bekannt, daß die Aktivitäten der lysosomalen Enzyme im Grundplasma polioinfizierter Zellen größer sind als die nicht infizierter Kontrollzellen. Deshalb sollte in einem ersten Versuch die Wirkung von Zellextrakt polioinfizierter Zellen auf Metaphasechromosomen der Wirkung von Extrakten nicht infizierter Zellen gegenübergestellt werden.

Hierfür wurde eine ROUX-Flasche mit HEp-2 Zellen mit Poliovirus Typ 1 Stamm MAHONEY (MPI = 1.2 x 10^2 PFU/Zelle) infiziert (Serie P). Eine weitere ROUX-Flasche wurde gleichzeitig phantominokuliert. Bei beiden Serien wurde nach einer Adsorptionszeit von 30 min das Inokulum abgesaugt und durch vorgewärmtes frisches Nährmedium ersetzt. Nach einem 5-stündigen Infektionsablauf wurde das überstehende Nährmedium verworfen und die Monolayerkultur zweimal mit isotoner PBS und einmal mit Sucrose-Tris-Puffer (s.u.) gewaschen. Danach wurde der Zellfilm mit einer Gummikratze vorsichtig von der Glasfläche abgelöst. Die Zellen wurden in Sucrose-Tris-Puffer resuspendiert und bei 500 xg 5 min lang abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment erneut in 5.0 ml Puffer resuspendiert. - Es folgte die Zerstörung der Zellen im DOUNCE-Homogenisator (25 x, Pistill A, Eisbad). Durch Differentialzentrifugation wurden die partikulären Fraktionen vom Grundplasma getrennt.

Der klare Überstand wurde auf fixierte, luftgetrocknete Chromosomen gegeben. Die Inkubationszeit bei 37° C betrug 2 Stunden. Nach Hydrolyse der Präparate erfolgte die Färbung nach GIEMSA. Die Serien K und P zeigten keinerlei Unterschiede.

Sucrose-Tris-Puffer (ZST), pH 7.1

4.5 ml 1 n HCl
25.0 ml TRIS-Stamm = 2.43 g Tris in 100 ml Aq.bidest.
8.55 g Sucrose (NBCo)
Aq.bidest. ad 100 ml

Versuch II

Im zweiten Versuch wurde die Zellkonzentration erhöht, um Präparationen mit größeren Enzymaktivitäten zu erzielen. Die doppelte Zellmenge (2 ROUX-Flaschen je Serie K und P) wurde in einem Zehntel des bisherigen Volumens an Puffer (0.6 ml) resuspendiert. Um vorzeitige Aktivitätsverluste zu vermeiden, wurde auf rasches Arbeiten Wert gelegt. Deshalb wurden mehrere Arbeitsgänge eingespart: So wurden die Monolayerkulturen vor dem Ablösen nicht gewaschen und alle Operationen wurden in PBS durchgeführt.

Das Substrat der Enzymreaktion war in diesem Versuch die im Vergleich zu fixierten Chromosomen etwas enzymempfindlicheren, isolierten Metaphasechromosomen. Sie wurden direkt im Zellextrakt resuspendiert. Um einen etwaigen Effekt der Extrakte zu erfassen, wurden extrem lange Inkubationszeiten (3 h, 6 h und 8 h) gewählt. Die histologische Aufarbeitung erfolgte vermittels Hydrolyse und Färbung nach GIEMSA. Wiederum waren keine Unterschiede zwischen den Serien K und P festzustellen.

Versuch III

In einem dritten Versuch wurde die Zellkonzentration und damit die Enzymkonzentration im Extrakt nochmals um den Faktor 4 erhöht (4 ROUX-Flaschen je Serie K und P; resuspendieren des Zellsedimentes in 0.3 ml PBS). Die Verwendung des DOUNCE-Homogenisators mit Pistill B ermöglichte eine

bessere Zerstörung der Zellen. Die Inkubation erfolgte wiederum mit isolierten Metaphasechromosomen für 3 h, 6 h und 9 h. Um eine Wirkung des Zellextrakts nicht durch Hydrolyse aufzuheben, wurde in diesem Versuch die Giemsafärbung sowohl mit als auch ohne Hydrolyse durchgeführt. Trotzdem waren bei den Präparaten der Serie K und P keine Enzymwirkungen festzustellen.

Versuch IV

Das gleiche Experiment wurde mit fixierten und luftgetrockneten Metaphaseplatten wiederholt. Gleichzeitig sollte in diesem Versuch festgestellt werden, ob das Versuchssystem auf die Wirkung von Nukleasen und Proteasen reagiert. Zu diesem Zweck wurden die oben beschriebenen Serien K und P durch zwei weitere (Serie D und T) ergänzt. Die Präparate der Serie D erhielten verschiedene Konzentrationen von Rinderpankreas-DNase (pH 7.0), die der Serie T verschiedene Verdünnungsstufen von Trypsin (pH 7.0). Die Inkubationszeiten in den Serien D und T betrugen nur 30 min. Die Präparate aller Versuchsserien wurden gleichzeitig hydrolysiert und nach GIEMSA gefärbt. Bereits bei 0.1 µg/ml DNase und bei 5 µg/ml Trypsin fanden sich typische morphologische Veränderungen der Chromosomen (vgl. S. $\frac{60\text{-}62}{64\text{-}66}$). Beim Vergleich der Reihen P und K jedoch war wiederum keine Enzymeinwirkung nachweisbar.

Versuch V

Da bekannt ist, daß die lysosomalen Hydrolasen ihre optimale Aktivität bei saurem pH haben, wurde der Versuch IV bei einem pH von 5.0 wiederholt. Als Puffer wurde isotoner Acetatpuffer verwendet. Das Ergebnis war auch in diesem Versuch negativ.

Versuch VI

Das Ziel des sechsten Versuches war nochmals die Enzymkonzentration im partikelfreien Überstand der Zellhomogenate zu erhöhen. Die Serien K und P wurden zur 7. Stunde nach der Inokulation aufgearbeitet, da inzwischen bekannt war (vgl. S. 49), daß die freie lysosomale Aktivität polioinfizierter Zellen zu diesem Zeitpunkt am größten ist.

Eine weitere, nicht infizierte Serie wurde angefertigt, deren Zellen durch Ultraschall homogenisiert wurden (Serie U). Die Beschallung führt zur völligen Zerstörung der Lysosomen und zu einer quantitativen Freisetzung der lysosomalen Hydrolasen. Wie auf Seite 48 ersichtlich, ist die enzymatische Aktivität derartiger Ultraschallextrakte etwa 5 mal so groß wie die polioinfizierter Zellen. Die Abtrennung restlicher partikulärer Bestandteile erfolgte in der Ultrazentrifuge. Als Puffer wurde wiederum der isotone Acetatpuffer mit einem pH von 5.0 verwendet.

Fixierte und luftgetrocknete Metaphaseplatten wurden für 30 min sowie für 4 Stunden mit den Zellextrakten der Serien K, U und P inkubiert. Die Präparate wurden 10 Stunden lang in OEM gefärbt und mit dem Phasenkontrastmikroskop untersucht. In keiner der drei Serien (K,U,P) war eine Enzymwirkung zu erkennen.

Versuch VII

In den drei nächsten Versuchen wurden die Zellextrakte nicht infizierter, durch Ultraschall homogenisierter Zellen im Ultrafilter um das 8- bis 10-fache eingeengt. Dadurch war eine große Steigerung der Enzymaktivität möglich. Zur Kontrolle wurde die Aktivität der lysosomalen DNase mit Kalbsthymus-DNS als Substrat bestimmt. Sie ist durch die Extinktion bei 260 m μ charakterisiert.

Im einzelnen wurde folgendermaßen verfahren. Die Zellen (4×10^8) von 6 ROUX-Flaschen wurden in 1.20 ml Acetatpuffer pH 5.0 resuspendiert und durch Ultraschallbehandlung zerstört. Anschließend wurden die Partikel bei 60.000 xg 20 min lang (+ 4° C) abzentrifugiert und der Überstand im Ultra-filter gegen isotonen Acetatpuffer pH 5.0 von 3.25 ml auf 0.5 ml (= 10 Tropfen) eingeengt.

Für die Aktivitätsbestimmung der freien lysosomalen DNase wurde eine Probe des Extraktes im Verhältnis 1:100 mit Puffer verdünnt. Nach der Methodik von Seite 41-44 ergab sich bei 260 m μ eine Extinktion, E = 0.220.

Für die Chromosomenuntersuchungen wurden fixierte, luftgetrocknete Metaphaseplatten direkt mit dem eingeengten Extrakt ultraschallhomogenisierter Zellen für 2 h, 4 h und 7 h inkubiert. Neben der GIEMSA-Färbung (mit Hydrolyse) wurde auch die FEULGEN'sche Nuklealreaktion verwendet. Trotz der im Zellextrakt nachgewiesenen hohen Konzentration lysosomaler DNase konnten weder im Phasenkontrastmikroskop noch im Hellfeldmikroskop enzymatische Veränderungen der Chromosomen festgestellt werden. Als Kontrollen wurden unbehandelte sowie mit Acetatpuffer inkubierte Präparate verwendet.

Versuch VIII

Im achten Versuch wurde wiederum die DNase-Aktivität des Zellextraktes bestimmt. Nach Verdünnung des eingeengten Extraktes um den Faktor 1:100 betrug die $E_{260\ m\ \mu} = 0.172$. 20 µg/ml Rindermilz-DNase (3'-Monoester-Former) führten zu einer $E_{260\ m\ \mu} = 0.100$. Selbst der unverdünnte Extrakt führte nach 2-stündiger Inkubation mit fixierten Chromosomenplatten zu keiner Veränderung der Chromosomen (Serie U).

Die histologische Aufarbeitung erfolgte wie im vorigen Versuch: GIEMSA- und FEULGEN-Färbung mit vorangehender Hy-

drolyse. Die Auswertung der Präparate wurde sowohl im Hellfeld als auch im Phasenkontrastmikroskop durchgeführt.

Versuch IX

Eine Wiederholung des Versuches Nummer VIII mit Rinderpankreas-DNase bei pH 7.0 brachte das gleiche Ergebnis. Auch zeigte die Rinderpankreas-DNase in Mischung mit eingeengtem Zellextrakt nicht die gewohnte enzymatische Chromosomenveränderung. Die alleinige Anwendung von eingeengtem Zellextrakt bei pH 7.0 war ebenfalls ohne Wirkung auf die Chromosomen.

Versuch X

Ein weiterer Versuch sollte feststellen, ob die im Zellextrakt enthaltene mikrosomale Fraktion für das beobachtete Ausbleiben einer enzymatischen Chromosomenveränderung durch Extrakte verantwortlich ist. Die Differentialzentrifugation (Abb.85) wurde hierfür in drei Schritten durchgeführt: Abtrennung der grobpartikulären Fraktion bei 4000 x g (Zellen, Kerne, grobe Fragmente und Aggregate), Entfernung von Partikeln in der Größenordnung von Mitochondrien und Lysosomen bei 12.000 x g (Extrakt U 1), Sedimentation der Mikrosomenfraktion bei 100.000 x g (Extrakt U 2). Der Versuch wurde bei pH 5.0 durchgeführt.

In beiden Extrakten (U 1, U 2) wurde die Aktivität der lysosomalen DNase durch Hydrolyse von Kalbsthymus-DNS und Extinktionsmessung bei 260 m µ bestimmt. Die Aktivität in dem Gemisch der Extrakte (U 1 + U 2) wurde ebenfalls ermittelt. Wie in den vorangegangenen Versuchen wurden als Vergleichswert die Extinktion einer DNase-lösung (D = 8 µg/ml saure DNase SCHUCHARDT) und die Extinktionen von Gemischen der DNase-lösung mit den Zellextrakten gemessen (D+U 1, D+U 2) (Tab.11).

Alle genannten Versuchsgruppen (U 1, U 2, U 1+U 2, U 1+D, U 2+D, D) wurden gleichzeitig in ihrer Wirkung auf fixierte Chromosomen getestet. Diese Untersuchung wurde durch eine Versuchsgruppe ergänzt, in der Pronase (P = 10 µg/ml Pronase SERVA) beziehungsweise Gemische von Extrakt und Pronase (P + U 1, P + U 2) für die Chromosomeninkubation verwendet wurden (Tab.11).

Die Präparate der Gruppe P zeigten die für die Pronase bekannten Chromosomenveränderungen (vgl. S.62-63). Keiner der Extrakte (U 1, U 2, U 1 + U 2) und keine Mischung von Extrakt und DNase (U 1 + D, U 2 + D sowie D) führte zu irgendeiner Veränderung der Chromosomen. Dagegen wiesen die Präparate der Serien P + U 1 und P + U 2 Pronasewirkung und gleichzeitig einen leichten DNase-Effekt auf. (Diesen Befund könnte man so deuten, daß die Pronase einen Hemmfaktor abgebaut hat, der die Einwirkung lysosomaler Enzyme auf Chromosomen (U 1, U 2, U 1 + U 2, D + U 1, D + U 2) verhinderte.)

Die Aktivitätsbestimmungen ergaben in Extrakt-DNase-Gemischen (U 1 + D, U 2 + D) eine kleinere DNase-Aktivität als in den einzelnen Lösungen. Das kann durch die Ungleichungen

$$E_{U1+D} < E_{U1} + E_D \quad \text{sowie} \quad E_{U2+D} < E_{U2} + E_D$$

symbolisiert werden.

Da diese Relationen in wiederholten Bestimmungen reproduziert werden konnten, kann man vermuten, daß saure DNase (D) in Mischung mit den Zellextrakten (U 1, U 2) ihre hydrolytische Eigenschaft gegenüber Kalbsthymus-DNS teilweise verliert.

Neben diesen Vermutungen, die durch weitere Versuche überprüft werden sollen, hat das beschriebene Experiment ein eindeutiges Ergebnis: In Zellextrakten vorhandene 100.000 x g - Fraktionen sind für das Ausbleiben einer lysosomalenzymatischen Chromosomenveränderung nicht verantwortlich.

Tabelle 11:

Chromosomeninkubation			Wirkung
U1-	0.24 ml U1 +	0.24 ml isotoner Acetatpuffer	-
U1-D-	0.24 ml U1 +	0.24 ml DNaselösung (D)	-
U1-P-	0.24 ml U1 +	0.24 ml Pronaselösung (P)	++
D-	0.24 ml D +	0.24 ml isotoner Acetatpuffer	-
P-	0.24 ml P +	0.24 ml isotoner Acetatpuffer	+
U2-	0.24 ml U2 +	0.24 ml isotoner Acetatpuffer	-
U2-D-	0.3 ml U2 +	0.3 ml DNaselösung (D)	-
U2-P-	0.3 ml U2 +	0.3 ml Pronaselösung (P)	++
U2-U1-	0.24 ml U2 +	0.24 ml U1	-

D = 16 µg/ml saure DNase SCHUCHARDT
P = 20 µg/ml Pronase SERVA
die Symbole "-" besagen eine geringere Konzentration im Vergleich zu den jeweiligen reinen Extrakten oder Enzymlösungen

Enzymbestimmungen		Extinktion
U1--	0.2 ml U1 + 1.8 ml isot.Acetat	0.800
U1--D--	0.2 ml U1 + 1.6 ml isot.Acetat + 0.2 ml D	0.760
U2--	0.2 ml U2 + 1.8 ml isot.Acetat	0.722
U2--D--	0.2 ml U2 + 1.6 ml isot.Acetat + 0.2 ml D	0.785
U2--D+	0.2 ml U2 + 1.8 ml D	0.810
D		0.012

0.8 ml U2 + 3.2 ml isot.Acetat	= U3	
300 µg/ml saure DNase	= D3	
1.5 ml U3 + 1.5 ml isotoner Acetatpuffer		0.638
1.5 ml D3 + 1.5 ml isotoner Acetatpuffer		0.625 0.880
1.5 ml D3 + 1.5 ml U3		0.870 0.795 0.793

D I S K U S S I O N

I. Einführung

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit den Chromosomenveränderungen, die das Poliomyelitisvirus Typ 1 Stamm MAHONEY in Gewebekulturzellen auslöst. Drei unterschiedliche Chromosomenveränderungen wurden gefunden: c-anaphase-ähnliche Chromosomenmodifikationen (CA), schwere diffuse Chromosomenveränderungen (6D) und Chromatidbrüche (B).

AULA und NICHOLS (1968) untersuchten in gleicher Weise das Poliomyelitisvirus Typ 3. Der Virusstamm wird nicht näher bezeichnet; offensichtlich wurde kein attenuierter Impfstamm verwendet. Der Infektionstiter betrug $10^{6 \cdot 5}$TCID$_{50}$. Vom virologischen Gesichtspunkt her ähnelt dieses System dem von uns untersuchten stark. Das wird durch die Arbeit von HABERMEHL et al. (1966a) unterstützt, nach der alle drei Typen des Poliomyelitisvirus eine Mitosesteigerung bewirken.

Hiernach ist es nicht erklärlich, daß die Verfasser keine Chromosomenveränderungen fanden. Allerdings fallen einige Dinge an der zitierten Arbeit auf. So liegen die Untersuchungstermine erst zur 6., 24. und 48. Stunde nach der Inokulation. Bei einem ordnungsgemäßen Verlauf des Virusreproduktionszyklus müßte aber der cytopathische Effekt bereits zur 9. Stunde völlig ausgebildet sein.

Somit gibt es nur drei Möglichkeiten, um die Ergebnisse von AULA und NICHOLS zu erklären. Entweder besaß das Inokulum keine ausreichende Virulenz, oder die infizierten Zellen waren resistent. Die dritte Möglichkeit liegt darin, daß infolge zu niedriger Infektionsmultiplizitäten die Reproduktion nicht in Form einer 1-Stufen-Wachstumskurve ablief

und so einen verzögerten Infektionsablauf vortäuschte. Da die Verfasser für die Reproduktion der verwendeten Viruscharge auf den untersuchten Gewebekulturzellen keine Titer angeben und auch durch kein Diagramm belegen, können die Ergebnisse nicht als gesichert angesehen werden.

II. C-anaphase-ähnliche Chromosomenmodifikationen (CA)

IIA. Allgemeines

ALBERT LEVAN beschreibt in seiner grundlegenden Arbeit aus dem Jahre 1938, "the effect of colchicine on root mitoses in Allium", die Wirkung des Alkaloids der Herbstzeitlose auf Pflanzenchromosomen. In der ersten Phase der Einwirkung erscheinen die Chromosomen in Form von c-Paaren. Dabei berühren sich die Schwesterchromatiden im Centromer und Telomer; im interstitiellen Bereich hingegen löst sich die Paarungsfigur ("loops"). Anschließend wird auch die telomere Paarung aufgehoben. Im Gegensatz zu dem normalen Verlauf der Mitose, bei dem als erste die Kinetochoren unter dem Spindelzug auseinanderweichen, ist die Trennung der Kinetochorregion unter Colchizineinwirkung am längsten verzögert. Erst nach mehreren Stunden (vgl. Diagramm 35) kommt es auch zur Trennung der Centomere; dann liegen die Schwesterchromatiden in einigem Abstand voneinander und sind parallel angeordnet (c-Anaphase nach LEVAN).

Unter dem Einfluß der Polioinfektion (Typ 1, Stamm MAHONEY) findet man die letztbeschriebenen Figuren bereits zu Beginn der c-Mitose, also in einem Stadium, das in den Kontrollen durch Paarung im Centromer gekennzeichnet ist.

IIB. Zeitpunkt des Auftretens, Eindeutigkeit und Signifikanz

Bereits zur 4. Stunde nach der Virusinokulation ist die Häufigkeit der CA statistisch signifikant erhöht; der Wahrscheinlichkeitswert beträgt bereits zu diesem Termin $P << 10^{-10}$. Der Anstieg der Regressionsgeraden (Probittransformation) für die CA zwischen der 4. und 7. Stunde nach der Infektion ist mit einem $Chi^2 = 1106$ hochsignifikant; die Wahrscheinlichkeit für die Reststreuung beträgt P = 6. Zur 6. Stunde nach der Infektion erreichen die CA Häufigkeiten bis zu 90 % verglichen mit Kontrollwerten von stets etwa 2 % (1500 Kontrollmetaphasen wurden ausgewertet).

Hinzu kommt, daß die Trennung im Centromer eindeutig zu erkennen ist, zumal meist sämtliche Chromosomen einer Metaphaseplatte betroffen sind. Aus diesen Gründen sind die CA das sicherste, chromosomale Merkmal für die Polioinfektion.

IIC. Auftreten von CA bei anderen Virusinfektionen

AULA und SAKSELA (1965) fanden bei Infektion diploider sowie aneuploider menschlicher Gewebekulturzellen mit SENDAI-Virus ebenfalls vermehrte CA. Nach voraufgegangener Despiralisation und Auflockerung der Chromosomen trennen sich bei weiter fortgeschrittener Schädigung die Kinetochoren; zusätzlich tritt bei vielen Metaphaseplatten eine Pulverisation auf. Die Verfasser haben diesen Typ der Chromosomenveränderungen nicht weiter untersucht.

IID. Auftreten von CA im Verlauf pathologischer Mitosen

Bei Pflanzenchromosomen wurden schon häufig c-anaphaseähnliche Erscheinungen in Zusammenhang mit gehemmten aty-

pischen Mitosen berichtet (z.B. TSCHERMAK-WOESS et al., 1953; GEITLER, 1948, 1951; CARNIEL, 1952; MECHELKE, 1952; vgl. auch NAGL, 1965).

Für die Diskussion und Erklärung der von uns aufgefundenen polioinduzierten CA ist interessant, daß der Zellzyklus auch in unserem System verändert ist. So kommt es zu einer Steigerung des Metaphaseindex (HABERMEHL et al., 1966a.b) durch vermehrtes Eintreten von Interphasen in die Prophase. Etwa nach der 4. Stunde p.i. sinkt der Mitoseindex aufgrund des einsetzenden CPE unter das Kontrollniveau. Bei Polioguanidineinwirkung bleiben die in der Metaphase befindlichen Zellen in der Metaphase arretiert liegen (HABERMEHL et al., 1969). Vielleicht stehen die Störungen des normalen Ablaufes des Zellzyklus hier wie dort in einem Zusammenhang mit dem vermehrten Auftreten von c-anaphase-ähnlichen Chromosomenbildern. Diese Möglichkeit wird durch den gehemmten Verlauf der Mitose nach Colchizineinwirkung unterstützt.

IIE. Auftreten der CA bei Endomitosen

Auch während der Endomitose (GEITLER, 1941) treten CA in Erscheinung. Man spricht hier von Endoanaphasen bzw. Endotelophasen. Wegen der starken Chromosomenspiralisierungen in den CA nach Polioinfektion (Abb.) gleichen die polioinduzierten CA Endotelophasen eher als Endoanaphasen.

Endomitosen wurden von zahlreichen Untersuchern bei Pflanzen und Tieren aufgefunden (z.B. HEITZ, 1944; GEITLER, 1953; LIPP, 1953; BIER, 1957; NUR, 1968). Eine ausführliche Übersicht bietet die Arbeit GEITLER's aus dem Jahre 1953. Nach GEITLER müssen wir die endomitotischen Prozesse als eine der Möglichkeiten von Organismen sowie von einzelnen Geweben ansehen, sich zu differenzieren; sie stehen damit neben der differentiellen Genaktivierung (z.B. puffing).

Im Gegensatz zu den oben erwähnten gehemmten Mitosen bleibt die Kernmembran bei der Endomitose stets erhalten. Schon aus diesem Grunde kann es sich bei den CA der Polioinfektion um keine echten Endomitosen handeln. Nur die Chromosomenbilder gleichen sich. Da aber gestörte, atypische Mitoseabläufe ebenfalls zu CA und zu Polyploidisierungen führen können (z.B. Colchizin), wäre zu fragen, ob auch die Polioinfektion polyploide Zellen schafft. Leider kann diese Frage nicht beantwortet werden, da der einsetzende cytopathische Effekt die Zelle zerstört und sie damit der weiteren Beobachtung entzieht. Immerhin ist ein derartiger Mechanismus denkbar. Er würde auf einfache Weise die numerischen Chromosomenaberrationen erklären, wie sie für Infektionen mit carcinogenen Viren charakteristisch sind (z.B. BLACK, 1963; AHLSTRÖM et al., 1964; KATO et al., 1964; CASSINGENA et al., 1965; JONEJA et al., 1965; BORENFREUND et al., 1966; KEAST, 1966; MARK, 1967; VRBA und DONNER, 1964, 1965; VESELY, SVOBODA und DONNER, 1966).

Da auch die Möglichkeit partieller Endoreduplikationen belegt ist (vgl. ALEKPEROV et al., 1967; DE GROUCHY et al., 1967), ließen sich Aneuploidien wie Polyploidien durch einen Mechanismus erklären. Dieser Zusammenhang ist noch nicht eingehender untersucht. Lediglich eine Arbeit von THOMAS et al. (1963) hat bei dem onkogenen SV-40-Virus ein Zusammentreffen numerischer Aberrationen, anormaler Mitosen und Allozyklien der Chromosomen aufgedeckt.

IIF. Allozyklie

Polioinfizierte Zellen sind, wie das Auftreten von CA zeigt, gegenüber nicht infizierten Kontrollzellen allozyklisch. Allozyklien sind in polioinfizierten Zellen auch noch durch weitere Kriterien belegbar. Wir finden die Chromosomen in der Metaphaseplatte regellos, d.h. ohne die für Metaphasen charakteristische Figur angeordnet (Abb.27)

(HABERMEHL et al., 1969). Untersucht man die Chromosomen polioinfizierter Zellen mit und ohne Colchizinzugabe, dann findet man eine Colchizin-ähnliche Verkürzung der Chromatiden und das Auseinanderweichen interstitieller Bereiche (S. 31-33). In einem weiten Sinn ist auch das vermehrte Eintreten von Interphasen in die Mitose (HABERMEHL et al., 1966) ein Allozykliephänomen. Zusätzlich können auch die polioinduzierten schweren diffusen Chromosomenveränderungen unter dem Begriff der Allozyklie eingeordnet werden (vgl. die Diskussion auf Seite 93).

WOLF (1960) führt an Hand seiner Untersuchungen über die Furchungsteilung bei Cloeon die Mitosekinetik auf regionale Allozyklien zurück. Dies ist so zu verstehen, daß beta-heterochromatische Regionen zur Abstoßung neigen. Führt ein Allozyklieverhalten also zur Umwandlung von Euchromatin in beta-Heterochromatin (WOLF, 1957,1963,1969), dann verändert sich die Morphologie der (Riesen)chromosomen durch Auseinanderweichen der Längsfibrillen.

Bei der Diskussion der schweren diffusen Veränderungen sowie bei der Besprechung der CA in Zusammenhang mit dem Ionengleichgewicht der infizierten Zellen werden wir zeigen, daß es tatsächlich zu einer Auflockerung der Metaphasechromosomen im Zusammenhang mit der Polioinfektion kommt. Diese kann durch Ablösung der Histone aus dem DNP-Komplex erklärt werden. Vielleicht beruht die in den CA vorliegende Abstoßung der Chromatiden auf einem derartigen Allozykliemechanismus.

IIG. Molekularbiologische Erklärungsmöglichkeiten

Welche Möglichkeiten beständen nun, um die CA auf einer molekularbiologischen Ebene zu erklären? Dabei bieten sich vor allem zwei Wege an.

Der erste geht von der echten c-Anaphase aus. Nach LEVAN (1938) besteht die c-Mitose in "an inactivation of the spindle apparatus, connected with delay of division of the centromere".

Der zweite geht von Veränderungen am Chromosom selbst aus. Es wird versucht, die Auflockerung der Chromosomen als Umwandlung von Euchromatin in beta-Heterochromatin zu deuten und die Abstoßung der Schwesterchromatiden gemäß der Allozykliehypothese von WOLF (1960) zu erklären.

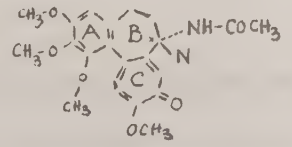
IIG1: Spindeleffekte

Zwar ist in keiner Weise bewiesen, daß polioinduzierte CA die gleichen Ursachen haben wie die echten von LEVAN beschriebenen c-Anaphasen; wir können aber mit einiger Berechtigung annehmen, daß gleiche morphologische Bilder auf die gleichen Ursachen zurückgehen. Direkte Spinduluntersuchungen sind an polioinfizierten Zellen unseres Wissens bisher nicht durchgeführt worden.

Der Effekt des Colchicins ist primär ein Spindeleffekt (vgl. EIGSTI und DUSTIN, 1957). Welche Vorstellung macht man sich über den Vorgang der Spindelinaktivierung? Nach den autoradiographischen Untersuchungen von BORISY und TAYLOR (1967) mit Colchicin-3H an KB-Zellen ist in den behandelten Zellen eine komplexe Verbindung von Colchicin und Protein nachweisbar.[1] Ein ähnlicher makromolekularer Komplex konnte bei in vitro Versuchen durch Zusatz von

---

1) Colchicin:



Colchicin-3H zum Überstand von Zellhomogenaten nachgewiesen werden. In Versuchen mit verschiedensten nativen Materialien, die reich an Mikrotubuli waren, konnten die Verfasser eine nicht-kovalente Bindung von Colchicin und Mikrotubuli wahrscheinlich machen. Vermutlich kommt es durch diese Bindung zur Rückbildung oder Inaktivierung der Spindel und zum Auftreten von c-Mitosen mit c-Anaphasen.

Auch SHEPRO et al. (1969) zeigen, daß die kontraktilen Eigenschaften der Blutplättchen, die die Verfasser auf die Wirkung eines Systems von Mikrotubuli und Mikrofibrillen zurückführen, durch Colchicinapplikation verlorengehen. Sie führen ihre Befunde auf einen ähnlichen Mechanismus wie die TAYLOR'sche Arbeitsgruppe zurück.

KLEINFELD et al. (1966) untersuchten die Wirkung von Colcemide auf Rattenlebern (in vivo) und HeLa-Zellen (in vitro). In den meisten Fällen wurde die Spindel noch gebildet, war jedoch gestaucht und geschrumpft. Kombiniert man diese Ergenisse mit denen der TAYLOR'schen Gruppe, so muß man annehmen, daß Colchicin durch Komplexbindung an die Proteine der Mikrotubuli die Spindel deformiert und auf diese Weise aktionsunfähig macht.

Gleiche Ursachen könnten für die polioinduzierten CA verantwortlich sein. Vielleicht läßt auch die polioinduzierte Hemmung der zelleigenen Proteinsynthese (VERNOERD und HAUSEN, 1963; BALTIMORE et al.,1963; EGGERS und TAMM, 1963; BABLANIAN, EGGERS und TAMM, 1965) Mikrotubuli nicht mehr zu stande kommen, so daß die Spindel gar nicht aufgebaut wird.

IIG2. Veränderungen des Ionengleichgewichtes der Zelle

Es ist auffällig, daß CA als Artefakte nach übermäßig langer hypotoner Behandlung anzutreffen sind. Metaphase-

chromosomen dekondensieren ebenso wie Riesenchromosomen in hypotonen Lösungen (CHERNICK et al., 1968); dies kann als Umwandlung von Euchromatin in beta-Heterochromatin angesehen werden. Die gleiche Umwandlung geschieht bei der Aktivierung bestimmter Genloci oder ganzer Chromosomen und Chromosomensätze, so bei schnellerem Ablauf der Insektenmetamorphose aufgrund von Wärmeaufzucht (WOLF, 1963) beim Puffing und bei den BALBIANI-Ringen (BEERMANN, 1962). Biochemisch gesehen liegt die Lockerung oder Aufhebung der komplexen Bindung von Histonen an die DNS zugrunde (ALLFREY und MIRSKY, 1963; ALLFREY et al., 1968; BONNER et al., 1968). Die gleichen Erscheinungen ruft der Chelatbildner EDTA an Metaphasechromosomen (Abb.86) und Riesenchromosomen (LEZZI, 1967) hervor. Ähnliche Auflockerungen findet man nach Applikation proteolytischer Enzyme - hauptsächlich Trypsin - (Metaphasechromosomen Abb.55-61, Riesenchromosomen vgl. BEERMANN, 1962), nach starker saurer Hydrolyse (Abb.87) und Einwirkung hoher Temperaturen (Abb.88). Offenbar nehmen die Längsfibrillen der Chromosomen unter dem Einfluß von Agentien, die das Ionengleichgewicht der Zelle verändern, einen größeren Abstand voneinander ein. Aus den Untersuchungen von KROEGER (1963,1964,1966), LEZZI (1966,1967) und BAUMANN (1968) ist bekannt, daß Änderungen im Elektrolythaushalt einer Zelle als Schaltmechanismen bei der genphysiologischen Aktivierung fungieren. An Riesenchromosomen führen sie zur sichtbaren Aktivierung bestimmter Loci in Gestalt von Puffs. Wie bereits erwähnt, ist der Vorgang des Puffing eine Umwandlung von Euchromatin in beta-Heterochromatin durch Desacetylierung der Histone (ALLFREY et al., 1968), die für die Kondensation und das 'supercoiling' der Chromosomen verantwortlich sind (ZUBAY, 1964).

Nach alldem wäre die Entstehung der CA durch virusbedingte Änderungen im Elektrolythaushalt der Zelle denkbar. Diese Änderungen können Euchromatin in beta-Heterochromatin durch Lösung der DNS-Histon-Bindung umwandeln. Damit wäre

eine Basis zur Erklärung der CA durch die WOLF'sche Allozykliehypothese vorhanden.

III. Die schweren diffusen Chromosomenveränderungen (6D)

IIIA. Begriffsbestimmung

Diffuse Chromosomenveränderungen sind Auflockerungen der Metaphasechromosomen, die auf kein spezifisches Chromosomensegment lokalisiert sind. So sprechen LEVAN und TJIO (1948) von einem "attack all over the chromosome" im Gegensatz zu dem distinkten "point effect".

IIIB. Zeitpunkt des Auftretens, Eindeutigkeit und Signifikanz

Im Laufe eines vollständigen Poliomyelitisvirus-Reproduktionszyklus (Typ 1, Stamm MAHONEY) treten etwa von der 4. Stunde nach Infektion ab sogenannte "schwere diffuse Chromosomenveränderungen" (vgl. BARTSCH et al., 1967,1969) in den Wirtszellen auf. Hemmt man den Reproduktionszyklus durch Guanidin, so unterbleibt eine signifikante Zunahme von 6D.

Auch in Kontrollpräparaten findet man gelegentlich diffuse Chromosomenveränderungen; häufig sind es Artefakte aufgrund mangelhafter Aufarbeitungstechniken. Zwischen diesen leichten Auflockerungen der Chromosomen und der von uns beschriebenen polioinduzierten völligen Zerstörung der Chromosomen ("destruction" FOGH et al., 1967; "extreme shattering of chromosomes" KATO, 1968) bestehen fließende Übergänge. Deshalb sind die 6D nicht so eindeutig zu diagnostizieren wie die oben beschriebenen CA. Wir haben aus diesem Grunde nur besonders weit fortgeschrittene Dekon-

densationen registriert (Qualitätsklasse 6, vgl. S.20 und Abb.19). Diese kommen bei Kontrollkulturen, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befinden, höchst selten (etwa 2 %) vor; sie können dagegen bis zu 55 % der polioinfizierten Zellen ausmachen.

Zu jedem Versuch (Serie P) wurde eine Kontrolle mit nicht infizierten Gewebekulturzellen (Serie K) angefertigt. Da die Präparate der Serien K und P blind ausgewertet wurden, kann eine subjektive Verfälschung des Ergebnisses ausgeschlossen werden.

IIIC. Auftreten diffuser Chromosomenveränderungen bei anderen Virusinfektionen

Diffuse Chromosomenveränderungen sind nicht nur im Falle des Poliomyelitisvirus beobachtet worden. Immer steht die Dekondensation der kompakten Metaphasechromosomen im Vordergrund.

Der Ausdruck "diffuse" wird von STICH et al. (1964) - (Herpes simplex Virus), SAKSELA et al. (1965) - (Sendai-Virus) und BOIRON et al. (1966) - (Herpes simplex Virus) verwendet.

Verfasser, die eine Spiralstruktur der Chromosomen (HUSKINS, 1941; OHNUKI, 1965,1968) annehmen, beschreiben die Dekondensation als Entspiralisierung. So sprechen AULA et al. (1966 - Sendai-Virus) und BENYESH-MELNICK et al. (1964 - Herpes-zoster-Virus) von "uncoiling" bzw. von einem "prophase like, uncoiled appearance", und STOLTZ et al. (1967) berichten von "coiling anomalies" bei Infektionen mit Adeno-12-Virus.

Da die Entspiralisierung oder Dekondensation zu prophaseähnlichen Bildern führt, treten an diffusen Chromosomen

zahlreiche Einschnürungen hervor. Derartige "secondary constrictions" werden von vielen Autoren erwähnt (SOFUNI et al., 1967; HUANG, 1967; KATO, 1967; KERKIS et al., 1967; TSUCHIDA et al., 1964; COHEN et al., 1965; YERGANIAN et al., 1963,1965,1966). Die Viren, mit denen die genannten Autoren arbeiteten, waren zu einem Teil Tumorviren (RSV, SV 40, Polyoma, Adeno Typ 7 12 18 31, FRIEND- und RAUSCHER-Virus und BURKITT-Tumor); hinzu kommen das HSV und das Virus der infektiösen Hepatitis.

Mehrere Verfasser betonen, daß die Einschnürungen stark ausgedehnt und außergewöhnlich zahlreich sind (COHEN et al., 1965: "the constrictions are greatly exaggerated and enhanced"). Das kommt in den folgenden Formulierungen zum Ausdruck: "accentuation of constrictions", "multiple secondary constrictions", "characteristic secondary constrictions", "pronounced secondary constrictions" (MILES et al., 1966,1967 - BURKITT-Tumor; HAMPAR und ELLISON, 1961 - Herpes simplex Virus; TOSHIMA et al., 1967 - BURKITT-Tumor; WOLMAN et al., 1964 - SV-40-Virus; COHEN und SHAW, 1965 - SV-40-, Polyoma- und Herpes-simplex-Virus).

Die sekundären Einschnürungen sind synonym mit den von MATSANIOTIS et al. (1966 - Virushepatitis) sowie von CHANG et al. (1966 - Rubella) beschriebenen gaps und den Färbelücken von COHEN et al. (1965 - "unstained segments") sowie von KATO (1968 - "negatively heteropycnotic segments"). Doch muß das Auftreten von Einschnürungen, gaps oder Färbelücken dem Begriff der Dekondensation untergeordnet werden.

Eine andere Gruppe von Untersuchern legt einen größeren Wert auf die virusinduzierten Veränderungen der Chromosomenrandzonen. Die 'Matrix' verliert ihre scharfen Konturen (AULA et al., 1966: "the edges were sometimes slightly fuzzy"), zeigt Erosionen (NICHOLS et al., 1964,1965,1966; vgl. auch LEVAN und TJIO, 1948 und NAGL, 1965) und neigt

zum Verkleben (BENYESH-MELNICK et al., 1964; MELLA et al., 1967 - "increased stickiness").

Wie die Darstellungen auf den Seiten 22-23 und die Abbildungen 17,18,19,22,23,26 zeigen, treffen die bei anderen Viren beschriebenen Eigenheiten diffuser Chromosomenveränderungen auch für die von uns bei Poliovirus beobachteten 6D zu. Im Vordergrund steht die Dekondensation der kompakten Metaphasechromosomen. Sie führt zu einem prophaseähnlichen Aussehen (Abb.89,90) mit zahlreichen Einschnürungen oder Erosionen. Zusätzlich verkleben die Chromomeren-ähnlichen Chromatinreste und fusionieren zu FEULGEN-positiven Blöcken.

In seltenen Fällen (92) gehen die Erosionen in Pulverisation über. Nach unseren Erfahrungen sind die virusinduzierten Pulverisationen (Masern: NICHOLS et al., 1964; Adeno-12: STICH et al., 1964; STOLTZ et al., 1967; Herpes simplex: STICH et al., 1964; Sendai: SAKSELA et al., 1965; AULA et al., 1966; KATO et al., 1968; Mumps, NDV: CANTELL et al., 1966; RSV: KATO, 1967, 1968; Gelbfiebervaccine: HARNDEN, 1964; Leukämie und BURKITT: MILES et al., 1966, 1967) nicht als zahlreiche Brüche sondern als schwere diffuse Chromosomenveränderungen zu verstehen.

Dafür sprechen die folgenden Tatsachen. NICHOLS et al. (1965) berichten, daß nur sehr selten Zellen mit mehreren Brüchen bei Maserninfektionen in vitro auftreten. Zwei Gruppen stehen sich ohne fließende Übergänge gegenüber: einzelne Chromatidbrüche und Pulverisationen. Hinzu kommt, daß die Abbildungen der zitierten Publikationen deutlich zeigen, daß bei Pulverisationen keine wirklichen Strukturdiskontinuitäten vorliegen; vielmehr handelt es sich um "unspezifische" (BAUCHINGER, 1968), d.h. diffuse Chromosomenveränderungen. Auch die große morphologische Ähnlichkeit von Pulverisationen mit den dekondensierten Chromo-

somen, wie sie nach Behandlung mit Actinomycin D auftreten (ARRIGHI und HSU, 1965), spricht gegen eine echte Diskontinuität der Chromosomenstruktur. Beide Veränderungen (ebenso die Pulverationen bei Sendai-Virus) werden in der späten G2-Periode oder sogar erst in der Prophase induziert. In dieser Periode ist eine Induktion von Brüchen höchst ungewöhnlich. Viel leichter ließe sich die Ursache der dekondensierten, mit Actinomycin behandelten Chromosomen auf die Pulverisationen anwenden. Hier wird angenommen, daß es durch Verlust der DNS-Histon-Bindung zu einer Auflockerung der Chromosomenstruktur kommt.

IIID. Auftreten diffuser Chromosomenveränderungen nach Infektionen mit Protozoen, Rickettsien und Mycoplasmen

Diffuse Chromosomenveränderungen wurden auch im Falle von Protozoeninfektionen beschrieben (PAVAN et al., 1966; SIMOES et al., 1966; PAVAN et al., 1967; ROBERTS et al., 1967; JURAND et al., 1967; DA CUNHA et al., 1968). In diesen Fällen wurden polytäne Speicheldrüsenzellen von Dipteren infiziert. Dadurch sind wir in der Lage, die Dekondensation der Chromosomen exakter zu beschreiben. Sie besteht in der Umwandlung von Euchromatin in beta-Heterochromatin (HEITZ, 1934; WOLF, 1969). Morphologisch erscheint die Umwandlung als geringere Fibrillendichte; auf einem ähnlichen Mechanismus beruht das Auftreten von BALBIANI-Ringen und Puffs (BEERMANN, 1962). Genphysiologisch sind diese Chromosomen aktiver. Biochemisch gesehen liegt eine Trennung der komplexen DNS-Histonbindung (BONNER et al., 1968) durch Desacetylierung zugrunde (ALLFREY et al., 1968). Die Histone haben genphysiologisch eine Repressorwirkung (BEERMANN, 1962; ALLFREY und MIRSKY, 1963; WANG, 1968; LEVINE et al., 1968; WILHELM et al., 1968; LITTAU et al., 1964) Außerdem haben die Histone eine Schutzwirkung für die DNS (MARINOZZI, 1966; CASPARY et al., 1968; MILNER et al.,1968).

Da die beschriebenen Protozoeninfektionen zu keinem CPE führten, könnte hier die genphysiologische Bedeutung der Histone zur Geltung kommen. Die Infektion führte zu einer Zunahme der DNS-codierten RNS- und Proteinsynthese (vgl. MORRIS, 1968).

Die von HALKKA (1967) beschriebene Infektion von Acheta mit Rickettsien führte zur Nekrose der befallenen Gewebe. Wie zu erwarten reagiert das Chromatin durch Dekondensation, der eine "general pycnotization and stickiness" folgt.

Ebenso kommt es bei Infektion von Gewebekulturzellen mit Mycoplasmen (FOGH und FOGH, 1965,1967; AULA et al., 1967) zu Auflockerungen der Chromosomen bis zur völligen Zerstörung ("destruction"). Die von den Verfassern beigegebenen Abbildungen zeigen eine große Ähnlichkeit mit den 6D-Chromosomen nach Polioinfektion.

Zusammenfassend können wir sagen, daß die hier beschriebenen diffusen Veränderungen durch Protozoen, Rickettsien und Mycoplasmen als Umwandlung von Euchromatin in beta-Heterochromatin erscheinen. Biochemisch könnte hierbei die Lösung der DNS-Histonbindung zugrunde liegen. Im Falle von Nekrosen kam es bei pyknotischen Chromosomen bis zur völligen Lysis des Chromatins.

IIIE. Diffuse Chromosomenveränderungen nach Einwirkung von Chemikalien

Diffuse Chromosomen werden auch nach Einwirkung zahlreicher chemischer Noxen beschrieben. Meist handelt es sich um stark toxische Substanzen oder um Substanzen in einem toxischen Konzentrationsbereich. So berichteten LEVAN und TJIO (1948) vom Auftreten pyknotischer Chromosomen nach Einwirkung verschiedener Phenole auf Allium cepa. D'AMATO (1950,1952) beschreibt Chromosomenzerstörungen bis zur

völligen Pulverisation, die durch Behandlung von Allium cepa mit Acridinen ausgelöst wurde. SHARMA (1967) findet derartige Erosionen und Pyknosen der Chromosomen nach Einwirkung von Antibiotika auf verschiedene Pflanzenarten. Nach ARRIGHI und HSU (1965) geht die Fähigkeit des Actinomycin D, Chromosomen zu dekondensieren, darauf zurück, daß das Antibiotikum an die DNS gebunden wird. Damit tritt kompetitiv eine Lösung der Histone aus dem DNP-Komplex ein, die zur Dekondensation der Chromosomen führt. Bemerkenswert ist, daß die Substanzen in der späten G2-Phase oder sogar erst in der Prophase appliziert wurden; die Dekondensation stellt also ähnlicherweise einen kurzfristigen Effekt dar wie die Pulverisationen durch bestimmte Viren.

Weiterhin haben die als "Spiralisierungsdefekte und Chromosomenzerfall" bezeichneten Effekte von 8-Hydroxychinoliniumphosphat (GEBHART, 1967) auf menschliche Leukozyten eine große Ähnlichkeit mit den von uns gefundenen 6D nach Polioinfektion. SCHMID und BAUCHINGER (1968) bezeichnen vergleichbar veränderte Leukozytenzellen nach Endoxanapplikation als U-Zellen. BAUCHINGER (1968) definiert U als "Zellen mit unspezifischen Chromosomenaberrationen (= nicht mit einer echten Diskontinuität der Chromosomenstruktur verbunden; gaps, Fusionen, pyknotische Chromosomen". Der Begriff unspezifisch deckt sich also mit dem Begriff diffuse. PETRES et al. (1968) finden nach Einwirkung von Arsen auf Gewebekulturzellen Pulverisationen, KATO (1968) das gleiche nach Einwirkung eines carcinogenen Kohlenwasserstoffes (7, 12-Dimetylbenz-alpha-anthrazen) (vgl. auch RAMEL, 1969).

WHITFIELD und PERRIS (1968) berichten von der Auflösung des kondensierten Chromatins nach Applikation von anorganischem Phosphat oder Phosvitin auf isolierte Kerne. Sie weisen nach, daß es dabei zu einer Lösung des DNP-Komplexes kommt. Als Folge hiervon wird DNS freigesetzt, die fusio-

niert. Die Fähigkeit DNP zu zerstören konnte durch Ca^{++} oder Mg^{++} gehemmt werden. Durch Hinzufügen von lysinreichem Histon kondensierte das Chromatin von neuem (vgl. auch DESAI et al., 1968; DICK et al., 1968).

IIIF. Diffuse Chromosomenveränderungen und Allozyklie

Da es sich bei den diffusen Chromosomenveränderungen um eine Dekondensation bzw. Entspiralisierung handelt, sind sie als Allozyklie des gesamten Chromosomensatzes anzusehen. Das wird durch die zitierten Arbeiten der PAVAN'schen Arbeitsgruppe an Riesenchromosomen bestätigt. Hier stellen sich die diffusen Veränderungen als Umwandlung von Euchromatin in beta-Heterochromatin dar. Es liegt damit ein echtes Allozyklie-Phänomen vor (WOLF, 1957,1963).

Durch die biochemischen Befunde werden diese Ansichten weiter unterstützt. Bei den bekannten Allozyklieerscheinungen (so z.B. bei Ruffs und BALBIANI-Ringen) liegt eine Ablösung der Histone zugrunde, die zu einer Dekondensation führt. Der gleiche ursächliche Zusammenhang von Histonablösung aus dem DNP-Komplex und Dekondensation wurde von ALLFREY und MIRSKY (1963), BEERMANN (1952), LITTAU et al. (1964), BASTIA et al. (1967), MILNER et al. (1968), ALLFREY et al. (1968) und DESAI et al. (1968) bestätigt.

IIIG. Diffuse Chromosomenveränderungen im Laufe der Meiose

Auch die meiotischen Prophasechromosomen können als diffuse Veränderungen diskutiert werden. Allerdings handelt es sich hier um einen Vorgang, der chronologisch den umgekehrten Verlauf nimmt. Die entspiralisierten Interphasechromosomen kondensieren, so daß schließlich negativ und positiv heteropyknotische Abschnitte in einer, für jede

Species charakteristischen Regelmäßigkeit aufeinander folgen.

Daß dieser Vergleich nicht nur ein oberflächlich morphologischer ist, konnte YERGANIAN in seinen Arbeiten mit verschiedenen Viren und Hamsterchromosomen zeigen. Es gelang ihm, die diffuse veränderten Metaphasechromosomen virusinfizierter Zellen mit den meiotischen Prophasechromosomen zu homologisieren. Als besonders geeignet erwiesen sich die Heterochromosomen. Alle Einschnürungen der virusveränderten, diffusen Chromosomen hatten ihre Lokalisation entsprechend den Einschnürungen nichtinfizierter Meiosechromosomen.

IIIH. Diffuse Chromosomenveränderungen im Laufe pathologischer Prozesse

Diffuse, pyknotische Chromosomen treten selbstverständlich auch bei degenerativen, chromatolytischen Prozessen auf. So im Falle von Virusinfektionen mit CPE, im Falle toxischer Substanzen, aber auch im Falle alternder, degenerierender Gewebe. Wie Abbildung 19 und 20 erkennen lassen, gleichen sich die Chromosomen absterbender Gewebekulturzellen und die 6D-Chromosomen nach Polioinfektion völlig. Auch bei der Involution von Geweben im Laufe der Insektenmetamorphose kommt es zu vergleichbaren Dekondensationen und Pyknosen von Riesenchromosomen (RIBBERT, 1967; WOLF, 1969).

LEUCHTENBERGER et al. (1950) haben eine biochemische Analyse der pyknotischen Degeneration von Zellkernen durchgeführt. Demnach sind Pyknose, Karyorrhexis und Chromatolyse durch einen proteolytischen Abbau der Histone und nachfolgende Depolymerisation der DNS gekennzeichnet. Die DNS fusioniert und nimmt dabei eine größere Massendichte ein (ROSCHLAU, 1965). Für die pyknotische Schrumpfung der

Kerne ist nach LEUCHTENBERGER ein Wasserverlust mitverantwortlich. Das Chromatin verliert an Details, wird zunehmend homogen und fusioniert in hohem Maße.

Da im Falle der Poliomyelitisinfektion ein enger zeitlicher Zusammenhang von CPE (mit Karyorrhexis) und dem Auftreten der 6D besteht, könnte man die 6D als CPE der Chromosomen auffassen. Diese Deutung wird durch die Versuche mit Guanidin gestützt. Hemmt man die Polioreproduktion durch Guanidin, so bleiben CPE sowie 6D aus. Der folgende Satz aus der zitierten Arbeit von LEUCHTENBERGER kann auch auf Chromosomen und Viren angewendet werden: "The cytological picture of such nuclei presents a rather uniform series of changes, whether a cell is damaged by X-rays, chloral, morphine, or other toxic agents, or whether the death of a cell is due to senescence or starvation."

III I. Polioinduzierte, schwere diffuse Chromosomenveränderungen und Proteolyse

Welche Beweise gibt es dafür, daß es sich bei den polioinduzierten 6D um eine Proteolyse mit anschließender Depolymerisation der DNS handelt? Zunächst ist festzustellen, daß die 6D-Chromosomen FEULGEN-positiv sind und durch DNase vollständig zum Verschwinden gebracht werden können. Kontrollchromosomen aus nichtinfizierten Zellen können durch DNase wohl zum Verblassen gebracht werden, lösen sich aber nicht vollständig auf. Immer bleibt im Phasenkontrastmikroskop eine zarte Struktur erkennbar, die unverändert die Umrisse und Gestalt von c-Metaphasechromosomen aufweist. Gleiche Ergebnisse mit DNase haben andere Autoren an Metaphasechromosomen (KRONE et al., 1965), an Riesenchromosomen (MAZIA et al., 1939; DUTT et al., 1959; KAUFMANN et al., 1956) und an Interphasechromatin (BASTIA et al., 1967) gewonnen.

Die Wirkung proteolytischer Enzyme schafft ein anderes Bild. Sie führen immer eine Veränderung der Chromosomenstruktur herbei. Einige ältere Arbeiten, in denen mit zellulären Proteasen keine Veränderungen der Chromosomen erzielt wurden, sind auf Verunreinigungen zurückzuführen (MAZIA, 1941, 1947).

Bei den von uns untersuchten Proteasen kommt es zu einer Auflockerung der Chromosomen durch Trypsin, Papain und Pronase. Die Wirkung der Collagenase besteht im Gegensatz dazu in einer Schrumpfung der Chromosomen.

Am charakteristischsten ist die Dekondensation der c-Metaphasechromosomen unter Trypsin. Sie wurde auch von anderen Autoren beschrieben, so von KRONE et al. (1965) bei Metaphasechromosomen, von LEZZI (1967), BEERMANN (1962), MAZIA (1941, 1947), KAUFMANN et al. (1956) und DESAI et al. (1968) an Riesenchromosomen. Trypsin spaltet speziell die X-lys- und die X-arg-Bindung (KARLSON, 1964) und greift damit bevorzugt die Histone an (BEERMANN, 1962, ALLFREY und MIRSKY, 1963, BOGDANOV et al., 1968). Einige nach Trypsineinwirkung gefundenen Metaphaseplatten (Abb91) ähneln sehr stark den 6D-Chromosomen nach Polioinfektion.

Da die Histone für das "supercoiling" der DNS verantwortlich sind, führt der Abbau der Histone durch Enzyme zur Dekondensation und Entspiralisierung (ZUBAY, 1964). Auch andere Verfahren, die zur Entfernung der Histone dienen, führen zu den gleichen Erscheinungen: so z.B. die saure Hydrolyse (MAIO et al., 1966; BENES et al., 1968), Hypotonie oder der Einfluß von EDTA (KAUFMANN et al., 1956; LEZZI, 1967).

Drei wesentliche Befunde sprechen für die Hypothese, daß schwere diffuse Chromosomenveränderungen nach Poliomyelitisinfektion eine proteolytische Genese haben: 1. die 6D sind FEULGEN-positiv, 2. sie lassen sich durch DNase vollständig abbauen, und 3. die Proteaseveränderungen von Metaphasechromosomen sind sehr ähnlich.

IIIJ. Das lysosomale Konzept

Die von DE DUVE et al. (1953) entdeckten Lysosomen beinhalten eine Reihe von Hydrolasen (vgl. KOLNICK und WOHLFARTH-BOTTERMANN, 1966; KRISCH, 1966). Es ist bekannt, daß die Freisetzung dieser Hydrolasen autolytische Prozesse hervorrufen kann. So wurde eine erhöhte lysosomale freie Aktivität bei verschiedensten Gelegenheiten nachgewiesen: Degeneration von Geweben (HEBERT et al., 1967; SHAMBERGER, 1968; CROSSLEY, 1968; YOUHOTSKY-GORE et al., 1968; ELENS et al., 1969), Strahlenschäden (BRANDES et al., 1967; HARRIS, 1967, 1968; WHITFIELD et al., 1967; WILLS et al., 1967; TABACHNICK et al., 1967; KOPITAR et al., 1968), Einwirkung von Chemikalien und hypotonen Lösungen, Involution (BRACHET et al., 1958; SCHEIB, 1963; WEBER, 1963; GREENBAUM et al., 1965; CROSSLEY, 1968; KAMPSCHMIDT et al., 1968; SHAMBERGER, 1969), Mitosestimulierung (ALLISON et al., 1964; HIRSCHHORN et al., 1965; RYAN et al., 1967; LAWRENCE et al., 1969) und eine Reihe von Virusinfektionen (ALLISON et al., 1963; WOLFF et al., 1964; MALUCCI et al., 1965; BONISSOL, 1966; FLANAGAN, 1966; HASSAN et al., 1966; DI SIMONE et al., 1967; MESTECKY et al., 1967; RAGETLI, 1967; AULA et al., 1968; KLEIN et al., 1968; LAWRENCE et al., 1968; THACORE et al., 1968; BARTSCH et al., 1969).

Aus dem Zusammenhang mit dem oben Gesagten geht hervor, daß es in vielen Fällen, bei denen lysosomale Enzyme freigesetzt werden, zu pyknotischen Dekondensationen der Chromosomen, zu sogenannten diffusen Veränderungen kommt. So entstand die Frage, ob auch in polioinfizierten Zellen lysosomale Hydrolasen in das Grundplasma freigesetzt werden. Wie wir zeigen konnten (BARTSCH et al., 1969) tritt eine signifikante Freisetzung lysosomaler Enzyme im Verlauf des vollständigen Poliomyelitisvirus-Reproduktionszyklus auf; sie fehlt bei der guanidingehemmten Reproduktion. Danach treten die lysosomalen Enzyme zusammen mit den 6D und dem CPE auf;

wenn sie fehlen, bleiben auch 6D und CPE aus.

Nachdem auf diese Weise eine Korrelation zwischen lysosomalen Enzymen und 6D nachgewiesen war, mußte geprüft werden, ob die Beziehung eine ursächliche ist. Wie berichtet, war es nicht möglich, Metaphasechromosomen durch Inkubation mit Grundplasma in irgendeiner Weise zu verändern, obwohl das Plasma hohe Aktivitäten lysosomaler Enzyme enthielt. Die Aktivität wurde hauptsächlich durch hydrolytische Spaltung von Kalbsthymus-DNS bestimmt. Pankreas-DNase von gleicher Aktivität führte zu einem völligen Verblassen der Metaphasechromosomen; die lysosomale DNase der Zellextrakte veränderte die Chromosomen nicht, obwohl sie gegenüber Kalbsthymus-DNS aktiv war. Offenbar enthält das Plasma einen Inhibitormechanismus, der die Wirkung der lysosomalen Hydrolasen auf die Chromosomen verhindert. Dieser Inhibitor ist nicht partikulär, da er auch nach Abtrennung der Mikrosomenfraktion im Grundplasma enthalten ist. Vermutlich bewirkt der gleiche Inhibitor auch den Aktivitätsverlust von Pankreas-DNase, die in das Grundplasma eingeführt wird. Bei den von uns untersuchten Konzentrationen verliert die Pankreas-DNase im Grundplasma sowohl ihre Fähigkeit, Kalbsthymus-DNS zu spalten, als auch die Fähigkeit, Chromosomen zu verändern. Es bleibt zu prüfen, ob hohe DNasekonzentrationen ebenfalls im Grundplasma ihre Aktivität einbüßen. Gibt man dem Grundplasma proteolytische Enzyme bei, so behalten sie ihre chromosomenverändernde Fähigkeit. Ihre Wirkung scheint sogar gesteigert, als käme eine DNasewirkung hinzu. Danach kann man vermuten, daß der gesuchte Inhibitor ein Protein ist. Wir sehen, daß eine ursächliche Beziehung zwischen der polioinduzierten Freisetzung lysosomaler Enzyme und den schweren diffusen Chromosomenschäden nicht direkt nachgewiesen werden konnte, obwohl ein solcher Zusammenhang möglich ist. Andererseits ist die Hypothese auch durch keine experimentellen Befunde eindeutig widerlegt.

Sie ist mit den Befunden von BRECHER et al. (1969) sowie WASILAUSKAS et al. (1969) in Einklang, die in der 100.000 x g - Fraktion von Escherichia coli wie auch von verschiedenen menschlichen Geweben einen nicht dialysierbaren Proteaseinhibitor fanden. Eine ganz andere Erklärungsmöglichkeit schlägt SHAMBERGER (1969) vor, indem er die Unfähigkeit der lysosomalen Hydrolasen, sich gegenseitig zu verdauen, als durch die Tertiärstruktur bedingt ansieht. Demnach ist eine räumliche Hinderung der aktiven Zentren das entscheidende Moment.

IV. Chromatidbrüche (B)

Unter Chromatidbrüchen verstehen wir nur echte Strukturdiskontinuitäten (SAX, 1940).

IVA. Auftreten und Signifikanz

Mit Poliomyelitisvirus Typ 1 Stamm MAHONEY infizierte Gewebekulturzellen zeigen von der 4. Stunde nach der Inokulation an vermehrt Chromatidbrüche. Der Häufigkeitszuwachs ist statistisch signifikant. Die Regressionsgerade (Probittransformation) für B steigt von der 4. bis zur 7. Stunde signifikant an ($P \ll 10^{-10}$; für die Reststreuung $P = 0.06$).

IVB. Unterscheidung zwischen echten Brüchen und gaps

Wie bereits erwähnt, haben wir nur eindeutige Strukturdiskontinuitäten der Chromatiden als Brüche gewertet. Dies entspricht den Ansichten von REVELL (1959) und SAX (1940), nach denen sich Bruch und achromatische Läsion wesentlich (z.B. in ihrem Restitutionsvermögen) unterscheiden.

Betrachtet man die gaps ebenfalls als Brüche, dann resultieren wesentlich höhere Bruchfrequenzen. So sind beispielsweise die unterschiedlichen Häufigkeiten zu erklären, die LEA (1955) einerseits und SAX (1940) andererseits für Strahlenschädigungen mitteilen. Vermutlich finden so auch die unterschiedlichen Ergebnisse für das Masernvirus eine Erklärung (NICHOLS et al., 1962-1967; FJELDE et al., 1962; TANZER et al., 1963; HARNDEN, 1964; SALKINDER et al., 1964; AULA, 1964, 1965; MAULER et al., 1965; GRIPENBERG, 1965; CHUN et al., 1965,1966; NORRBY et al., 1965; LEAO et al., 1966; RADSEL-MEDVESCEK et al., 1967; DE GROUCHY et al., 1967; RENDA, 1968; GROVER et al., 1968), zumal die Arbeitsgruppe um NICHOLS (vgl. NICHOLS, 1963) - die sehr hohe Bruchfrequenzen berichtet - auch gaps als Brüche einordnet, wie Abbildungen und Text zeigen ("Brüche vom Erosionstyp").

Nicht immer ist es eindeutig, ob ein Bruch oder ein gap vorliegt. Manche Autoren bezeichnen nur solche Strukturdiskontinuitäten als echte Brüche, bei denen zu der mikroskopisch erkennbaren Unterbrechung die Dislokation des acentrischen Fragmentes hinzukommt. Allerdings gibt es keine verbindlichen Kriterien, wie groß eine derartige Dislokation sein müsse, um von einem Bruch sprechen zu dürfen. Auch ist nicht einzusehen, warum eine morphologisch erkennbare Strukturdiskontinuität ohne Verlagerung des distalen Segmentes kein Bruch wäre. Demnach sind diesbezügliche Ergebnisse zu einem guten Teil vom Untersucher abhängig. Bei unseren Untersuchungen wurde ein Bruch angenommen, wenn eine Tendenz zur Dislokation sichtbar war.

Unsere Ergebnisse mit Poliovirus (Serie P) wurden stets mit einer gleichzeitig angesetzten Serie nicht infizierter Kontrollzellen (Serie K) verglichen. Da beide Serien blind ausgewertet wurden, ist eine subjektive Beeinträchtigung des Ergebnisses ausgeschlossen.

Fragt man nach dem Mechanismus der poliobedingten Bruchentstehung, so ist es von Wichtigkeit, ob die in der Metaphase beobachteten Brüche primär virusinduziert sind, oder aber auf einen virusinduzierten "labilen" (ÖSTERGREN und WAKONIG, 1954) bzw. "metastabilen" (RIEGER und MICHAELIS, 1965) Zwischenzustand zurückgehen. Diese "potentiellen Läsionen" (RIEGER und MICHAELIS, 1965) in Art eines 'weak point' könnten durch die Einwirkung mechanischer Kräfte in echte Brüche übergehen. Wie bei der Diskussion der schweren diffusen Chromosomenveränderungen erwähnt wurde, führt die Polioinfektion zu zahlreichen sekundären Konstriktionen an der Chromatide. Möglicherweise handelt es sich hierbei um Entspiralisierungen oder Dekondensation. Die Entstehung von Brüchen in solchen Bereichen wäre durch die Tatsache erklärbar, daß Einschnürungen besonders anfällig für Brüche sind (z.B. RIEGER und MICHAELIS, 1965; SRIVASTAVA, 1966; NEWMAN, 1966; ENGEL et al., 1967).

Es existieren zwei Gruppen von Kräften, die potentielle Läsionen in echte Brüche umwandeln können: Kräfte in der lebenden Zelle, d.h. vom Zeitpunkt der Induktion des labilen Zustandes bis zur Fixierung, und Kräfte, die in der Zeit von der Fixierung bis zur Beobachtung auf die Chromosomen wirken.

Bei der ersten Gruppe ist vor allem an die Zugkräfte in der Anaphase zu denken (vgl. RAPPAPORT, 1967), wie auch an die Quellungsbewegungen während der hypotonen Behandlung. DOERNER hat 1967 die Existenz erheblicher Druckgradienten in der lebenden Zelle berechnet. Auch die im Verlauf der Chromosomendarstellung durchgeführten Zentrifugationen müssen in diesem Zusammenhang besprochen werden. KUMAR und NATARAJAN (1966) beobachteten nach 22-stündiger Zentrifugation bei 4000 x g von bestrahlter Gerste eine Zunahme der Brüche.

Nach der Fixierung wirken starke Kräfte während der Ausbreitung (Lufttrockenmethode nach ROTHFELS und SIMINOVITCH, 1957) der Metaphasen. Sie sind durch die niedrige Oberflächenspannung ($\sigma - \delta^{s}$) des Fixiergemisches bedingt. Die Oberflächenspannung des von uns verwendeten Fixierungsmittels beträgt etwa $\sigma = 25{,}1$ Dyn / cm, bei 20^{o} C (zum Vergleich $\sigma_{H2O} = 72{,}8$). Die Flächenzunahme beim Verlaufen eines Tropfens der Zellsuspension ist erheblich. Beim Abflammen der Objektträger wird die Oberflächenspannung stark erniedrigt; derart gewonnene Präparate zeigen auch im Falle nicht behandelter Kontrollzellen eine erhöhte Bruchfrequenz. Um eine günstige Ausbreitung der Metaphaseplatten zu erreichen, wird das Verlaufen des Tropfens durch einen kräftigen Luftstrom gefördert. Dabei treten abermals große Kräfte auf.

IVC. "Pseudofragmentation" (WOLF, 1963)

Demnach sind mechanische Kräfte nachweisbar, die labile Zwischenzustände der Chromosomen in echte Brüche umwandeln können. An den stärker differenzierten Riesenchromosomen der Insekten ist ein solcher Entstehungsgang von Brüchen für ein Polyhedrosevirus (DIAZ und PAVAN, 1965; PAVAN und BASILE, 1966) nachgewiesen. Hier führt die nukleare Infektion mit dem DNS-Virus zur Hypertrophie der Chromosomen und zur Ausbildung von 'weak points'. Die Beobachtungen wurden an den Polytänchromosomen des Drüsenventrikels (Coeca) sowie eines distalen Abschnittes des Mesenterons durchgeführt. Die 'weak points' gingen bei der Herstellung von Quetschpräparaten in Pseudofragmentationen (WOLF, 1963) über.

WOLF (1963, 1969) konnte an den polytänen Speicheldrüsenchromosomen von Phryne cincta zeigen, daß alpha-hetrochromatische Blöcke (HEITZ, 1934) während der Streckung der Riesenchromosomen zu feinen FEULGEN-positiven alpha-Fäden reduziert werden. WOLF deutet diesen Vorgang als Abnahme

von "supplementärem Material" (vgl. auch die folgenden Arbeiten über "extra-DNS" oder "metabole-DNS": BRACHET, 1957; NAGL, 1965, 1967; BEERMANN, 1966; KEYL et al., 1966; ROTHFELS et al., 1966; BERENDES et al., 1967; BIER et al., 1967; CHIANG et al., 1967; HAMMAR, 1967; SLIZYNSKI, 1967; WEBER, 1967, 1968; LIMA DE FARIA, 1968; AMMERMANN, 1968; SORSA, 1969; MILLER et al., 1969; LINTS et al., 1969; KUNZ, 1969; FICQ et al., 1969; GALL et al., 1969 im Sinne des DARLINGTON'schen "starvation"-Effektes (DARLINGTON und KOLLER, 1947). Der Vergleich mit PAVAN's Beobachtungen nach Virusinfektionen von Insekten ist berechtigt, da auch in letzterem Fall die 'weak points' an heterochromatischen Banden auftraten.

Alpha-Fäden durchspannen oft große Flächen, so daß das distale Fragment auf der einen Seite, das Rumpfstück des Chromosoms auf der anderen Seite des Kernes liegt. Platzt der Kern bei der OEM-Quetschtechnik (vgl. WOLF, 1957) auf, dann verläuft der Faden über große Areale des Präparates. Zerreißt er bei übermäßigem Quetschen, dann weist nicht selten ein alpha-heterochromatischer, dornartiger Fortsatz des Rumpfstückes in Richtung auf das acentrische Fragment. Der ungeübte Untersucher würde entweder von einem Bruch sprechen, oder die Chromosomenkonstitution des Kernes durch einen nicht vorliegenden Rekombinationstyp deuten (beispielsweise kann bei Phryne cincta das rekombinierte X vom Typ cb nach Pseudofragmentation als bb misdeutet werden).

Wir sehen, daß selbst bei den stark differenzierten Riesenchromosomen die Feststellung der Bruchhäufigkeiten zu Irrtümern führen kann. Pseudofragmentationen täuschen oft eine zu hohe Bruchfrequenz vor. Wir nehmen an, daß ein Teil der poliobedingten Brüche auf einem ähnlichen Wege entsteht: Die Virusinfektion führt zu einem labilen Zwischenzustand, der durch geeignete Kräfte in einen echten Bruch übergeht.

IVD. Molekularbiologische Erklärungen für die polioinduzierten Chromatidbrüche (B)

Für primär virusinduzierte Chromatidbrüche werden hauptsächlich zwei Ursachen in Betracht gezogen: die Freisetzung lysosomaler Enzyme (ALLISON, 1967) oder die Hemmung der zelleigenen NS- (NICHOLS, 1966) oder Proteinsynthese. Welche dieser Ursachen kann für die poliobedingten Chromatidbrüche verantwortlich sein?

Um diese Frage zu klären, wurden zwei unterschiedliche Systeme miteinander verglichen: der vollständige Poliomyelitisvirus-Reproduktionszyklus und die unvollständige, durch Guanidin gehemmte Virusreproduktion. Der vollständige Reproduktionszyklus ist durch viruscodierte Hemmung der zelleigenen NS- und Proteinsynthese in den frühen Stadien (VERWOERD und HAUSEN, 1963; EGGERS und TAMM, 1963; BALTIMORE et al., 1963; BABLANIAN, EGGERS und TAMM, 1965; HABERMEHL, 1966b) und Freisetzung lysosomaler Enzyme in den späten Stadien (BARTSCH et al., 1969) gekennzeichnet. Hemmt man die Polioreproduktion durch Guanidin, so laufen die frühen Stadien noch ungestört ab. So kommt es weiterhin zu den frühen Abschaltmechnismen durch "early proteins", die zur Hemmung der zelleigenen Protein-, RNS- und DNS-Synthese führen. Die Poliovirus-RNS-Polymerase hingegen wird nicht mehr gebildet. Dadurch bleiben späte Stadien der Virusinfektion aus (cytolathischer Effekt, Virusfreisetzung). Unter diesen experimentellen Bedingungen kommt es zu keiner vermehrten Freisetzung lysosomaler Enzyme.

Bei vollständiger Reproduktion treffen wir demnach sowohl die Hemmung zelleigener Synthesen als auch die vermehrte Freisetzung lysosomaler Hydrolasen an; bei guanidingehemmter Reproduktion ist nur die Hemmung der zelleigenen Synthesen nicht aber eine Freisetzung lysosomaler Enzyme anzutreffen.

Chromosomenuntersuchungen zeigen, daß die Häufigkeit der Chromatidbrüche in beiden Systemen statistisch signifikant erhöht ist (BARTSCH et al., 1967). Demnach können die B nicht auf die lysosomalen Enzyme, sondern nur auf die virusbedingte Hemmung der zelleigenen DNS-Synthese (oder auf eine dritte Ursache) zurückgehen. ALLISON's (1967) Hypothese, nach der eine virusinduzierte Freisetzung lysosomaler DNase zu Chromatidbrüchen führen soll, kann von uns nicht bestätigt werden (vgl. VENUAT et al., 1969).

Ferner muß die Fähigkeit lysosomaler DNase, Brüche hervorzurufen, überhaupt in Frage gestellt werden. Es ist kaum einzusehen, daß ein Enzym einen (lokalisierten) Punkteffekt am Chromosom hervorruft. Die von ALLISON herangezogenen Arbeiten von LEZZI (1965), nach denen DNase zu Strukturdiskontinuitäten von Riesenchromosomen führt, stehen im Gegensatz zu allen bisherigen Ergebnissen mit DNase und Riesenchromosomen (MAZIA et al., 1939; FROLOVA, 1944; CATCHESIDE et al., 1947; DUTT und KAUFMANN, 1959; KAUFMANN et al., 1960). Hier führte die DNase-Behandlung nie zu Strukturdiskontinuitäten sondern zum Verblassen der Chromosomen. Das wird durch unsere Untersuchungen an Metaphasechromosomen wie auch durch ähnliche Untersuchungen von KRONE et al. (1965) bestätigt. Wir nehmen an, daß LEZZI's Ergebnisse auf der von ihm angewandten Applikation der DNase in Kristallform beruhen.

Zusammenfassung

1. a) Die Infektion von Gewebekulturzellen mit Poliomyelitisvirus Typ 1 Stamm Mahoney führt zu einer Reihe von Chromosomenveränderungen.
   b) Vorbedingung ist, daß die Wirtszellen für das Poliomyelitisvirus empfänglich sind.

2. Bei einem vollständigen Ablauf des Virusreproduktionszyklus treten zur 4. Stunde c-anaphaseähnliche Chromosomenmodifikationen (CA), schwere diffuse Chromosomenveränderungen (6D) und Chromatidbrüche (B) auf.

3. Die Häufigkeiten jeder der drei Chromosomenveränderungen steigen von der 4. bis zur 7. Stunde nach Infektionsbeginn an. Die Häufigkeitskurven der drei genannten Parameter als Funktion der Zeit sind signifikant voneinander verschieden.

4. Im späteren Verlauf einer unvollständigen, durch Guanidin unterbrochenen Poliomyelitisvirusreproduktion wird ebenfalls ein vermehrtes Auftreten von c-anaphaseähnlichen Chromosomenmodifikationen (CA) und Chromatidbrüchen (B) beobachtet. Im Gegensatz zum vollständigen Poliomyelitisvirus-Reproduktionszyklus fehlen hier die schweren diffusen Chromosomenveränderungen (6D). Zusätzlich tritt ein Colchicin-ähnlicher Effekt auf.

5. Der Vergleich der Chromosomenveränderungen in den beiden Versuchssystemen (vollständige bzw. guanidingehemmte Virusreproduktion) zeigt, daß die c-anaphaseähnlichen Chromosomenmodifikationen (CA) und die Chromatidbrüche (B) durch die frühen Stadien der Reproduktion verursacht

werden, die schweren diffusen Chromosomenveränderungen (6D) hingegen in späten Stadien, die zeitlich nach der Bildung der Poliovirus-RNS-Polymerase liegen. - Dementsprechend werden als Ursache der c-anaphaseähnlichen Chromosomenmodifikationen und der Chromatidbrüche die frühe, viruscodierte Hemmung der zelleigenen Protein- und Nukleinsäuresynthese diskutiert.

6. Die Ursachen der schweren diffusen Chromosomenveränderungen werden eingehender untersucht:

a) Das Aussehen der schweren diffusen Chromosomenveränderungen, sowie ihr zeitliches Auftreten erlauben es, sie als Teil des Poliovirus-CPE anzusehen.

b) Selektive Färbungen und Abbauversuche mit DNase legen eine proteolytische Entstehung der schweren diffusen Chromosomenveränderungen nahe. Dies wird durch Untersuchungen erhärtet, die sich mit der Wirkung von Proteasen und Nukleasen auf fixierte sowie native isolierte Metaphasechromosomen befassen. Dabei hat DNase einen Verlust der Färbbarkeit zur Folge, wobei die typische c-Metaphasechromosomen-Struktur erhalten bleibt. Proteasen führen hingegen zum Verlust der Struktur unter Beibehaltung der Färbbarkeit.

c) Als Ursache der schweren diffusen Chromosomenveränderungen wird eine polio-bedingte Freisetzung lysosomaler Enzyme angesehen. Dies wird durch das Auftreten freier lysosomaler Enzyme im Laufe des vollständigen Poliomyelitisvirus-Reproduktionszyklus und das Fehlen einer derartigen Freisetzung bei unvollständiger, durch Guanidin unterbrochener Reproduktion belegt.

7. Bedingt durch den vollständigen Poliomyelitisvirus-Reproduktionszyklus werden in den infizierten Zellen lysosomale Enzyme aus der partikulären in die lösliche Fraktion freigesetzt. Die saure DNase und die saure Phosphatase werden in partikelfreien Zellhomogenaten als lysosomale Testenzyme bestimmt. Die freie Aktivität der sauren DNase steigt von der 2. bis zur 7. Stunde, die der sauren Phosphatase von der 4. bis zur 7. Stunde nach Infektionsbeginn an. - Bei unvollständiger durch Guanidin unterbrochener Reproduktion fehlt der für den vollständigen Reproduktionszyklus nachgewiesene Anstieg der freien lysosomalen Aktivität.

8. Die Inkubation von Metaphasechromosomen mit Zellextrakten, welche hohe Aktivitäten freigesetzter lysosomaler Enzyme enthalten, führt zu keiner Schädigung der Chromosomen. Mehrere Wiederholungen und Modifikationen dieser Versuche zeigen, daß das Vorhandensein eines komplexen Schutzmechanismus angenommen werden kann.

A B K Ü R Z U N G E N

K	Kontrolle
P	infiziert mit Poliomyelitisvirus Typ 1 Stamm Mahoney
PFU	plaque forming units
MPI	multiplicity of infection
MAH	Poliomyelitisvirus Typ 1 Stamm Mahoney
CPE	cytopathischer Effekt
G	mit Guanidin behandelt
PG	infiziert mit Poliomyelitisvirus und behandelt mit Guanidin
E	Eagle minimum essential medium
KS	Kälberserum
U	mit Ultraschall behandelt
CA	c-Anaphase-ähnliche Chromosomenmodifikation
6D	schwere diffuse Chromosomenveränderung
B	Chromatidbruch
Co	mit Colchizin (= Colcemide CIBA) behandelt
HEp-2	Zellstamm : human epithelial cell line
WI-38	Zellstamm : diploide WISTAR-Zellen Stamm 38

Tabelle 1: Chromosomenschäden 6 Std. nach Polioinfektion verschiedener Gewebe

Gewebe	Q		O	CA	6 D	B
Diploides foetales Intestinum	1 - 4	K	63 % = 428/675	-	-	6 % = 41/675
		P	26 % = 44/171 X^2 = 79 P $\ll 10^{-10}$	-	-	14 % = 24/171 X^2 = 12 P = 0,0005
	1 - 6	K	58 % = 349/602	3 % = 8/300	3 % = 18/602	3 % = 19/602
		P	19 % = 97/511 X^2 = 175 P $\ll 10^{-10}$	74 % = 94/127 X^2 = 129 P $\ll 10^{-10}$	20 % = 101/511 X^2 = 82 P $\ll 10^{-10}$	10 % = 52/511 X^2 = 23 P = 10^{-6}
WI - 38	1 - 6	K	60 % = 116/193	2 % = 2/123	7 % = 14/193	16 % = 31/193
		P	4 % = 6/162 X^2 = 124 P $\ll 10^{-10}$	91 % = 62/68 X^2 = 158 P $\ll 10^{-10}$	33 % = 54/162 X^2 = 92 P $\ll 10^{-10}$	41 % = 67/162 X^2 = 28 P = 10^{-7}
HEp-2	1 - 6	K	87 % = 87/100	2 % = 7/300	6 % = 30/500	3 % = 3/100
		P	0 % = 0/100 X^2 = 154 P $\ll 10^{-10}$	92 % = 275/300 X^2 = 480 P $\ll 10^{-10}$	41 % = 203/500 X^2 = 178 P $\ll 10^{-10}$	30 % = 30/100 X^2 = 26 P = 10^{-7}
	1 - 6	K	87 % = 87/100	2 % = 2/100	6 % = 6/100	5 % = 11/200
		P	4 % = 4/100 X^2 = 101 P $\ll 10^{-10}$	85 % = 85/100 X^2 = 140 P $\ll 10^{-10}$	30 % = 30/100 X^2 = 20 P = 10^{-5}	25 % = 25/100 X^2 = 18 P = 2×10^{-5}
	1 - 6	K	88 % = 88/100	2 % = 4/200	4 % = 8/200	7 % = 7/100
		P	1 % = 1/100 X^2 = 153 P $\ll 10^{-10}$	98 % = 196/200 X^2 = 369 P $\ll 10^{-10}$	44 % = 88/200 X^2 = 87 P $\ll 10^{-10}$	30 % = 30/100 X^2 = 18 P = 2×10^{-5}

Tabelle 2: Häufigkeit polioinduzierter Chromosomenschäden in Abhängigkeit von der Zeit (HEp-2-Zellen)

Std. nach Infektion	CA	6D	B
0	2 % = 16/800 X^2 = 0 P = 1,0	6 % = 34/600 X^2 = 0 P = 1,0	4 % = 24/600 X^2 = 0 P = 1,0
1	3 % = 3/100 X^2 = 0,43 P = 0,51	4 % = 12/300 X^2 = 1,1 P = 0,3	2 % = 2/100 X^2 = 0,95 P = 0,3
2	2 % = 2/100 X^2 = 0 P = 1,0	8 % = 24/300 X^2 = 1,8 P = 0,18	3 % = 3/100 X^2 = 0,25 P = 0,62
3	1 % = 1/100 X^2 = 0,48 P = 0,58	7 % = 7/100 X^2 = 0,25 P = 0,62	5 % = 5/100 X^2 = 0,23 P = 0,65
4	8 % = 8/100 X^2 = 12,3 P = 0,0004	10 % = 41/300 X^2 = 17 P = 3×10^{-5}	14 % = 28/200 X^2 = 25 P = 10^{-6}
5	51 % = 51/100 X^2 = 310 P $\ll 10^{-10}$	33 % = 33/100 X^2 = 74 P $\ll 10^{-10}$	21 % = 21/100 X^2 = 42 P $\ll 10^{-10}$
6	88 % = 704/800 X^2 = 1195 P $\ll 10^{-10}$	56 % = 224/400 X^2 = 318 P $\ll 10^{-10}$	24 % = 48/200 X^2 = 73 P $\ll 10^{-10}$

Tabelle 3: Durch hochgereinigtes Poliovirus induzierte Chromosomenschäden in Abhängigkeit von der Zeit

Std. nach Infektion	CA	6D	B
0	2 % = 2/100 X^2 = 0 P = 1,0	6 % = 6/100 X^2 = 0 P = 1,0	4 % = 4/100 X^2 = 0 P = 1,0
1	2 % = 2/100 X^2 = 0 P = 1,0	4 % = 4/100 X^2 = 0,4 P = 0,5	3 % = 3/100 X^2 = 0,2 P = 0,6
2	2 % = 2/100 X^2 = 0 P = 1,0	6 % = 6/100 X^2 = 0 P = 1,0	4 % = 4/100 X^2 = 0 P = 1,0
3	2 % = 2/100 X^2 = 0 P = 1,0	8 % = 8/100 X^2 = 0,3 P = 0,6	6 % = 6/100 X^2 = 0,4 P = 0,5
4	5 % = 5/100 X^2 = 1,3 P = 0,24	11 % = 11/100 X^2 = 1,6 P = 0,2	13 % = 13/100 X^2 = 5,2 P = 0,02
5	47 % = 47/100 X^2 = 55 P $\ll 10^{-10}$	25 % = 25/100 X^2 = 14 P = 0,0002	21 % = 21/100 X^2 = 13 P = 0,0003
6	85 % = 85/100 X^2 = 140 P $\ll 10^{-10}$	30 % = 30/100 X^2 = 20 P = 10^{-5}	25 % = 25/100 X^2 = 18 P = 2×10^{-5}

Tabelle 4: CA, 6D, B in Abhängigkeit von der Zeit
Regressionen nach der Probittransformation

	CA		6D		B	
	X^2	P	X^2	P	X^2	P
Regression						
0 - 3h	0,2	0,65	3,42	0,08	0,013	0,93
3 - 6h	1106	$\ll 10^{-10}$	355	$\ll 10^{-10}$	73	$\ll 10^{-10}$
Rest-Streuung						
0 - 3h	0,8	0,68	1,88	0,39	1,74	0,43
3 - 6h	6	0,05	2,1	0,35	5,8	0,06

	Korrelation / Regression		
	CA/6D	CA/B	6D/B
D_1 0 - 3h	2,51	0,16	1,62
3 - 6h	130	219	24,50
P 0 - 3h	0,11	0,69	0,20
3 - 6h	$\ll 10^{-10}$	$\ll 10^{-10}$	5×10^{-6}
F 0 - 3h	2,71	0,64	0,90
3 - 6h	- 1,13	1,26	0,55

Tabelle 5: Chromosomenschäden nach Polioguanidin (12 Std., HEp-2); () Vergleichswerte eines zweiten Versuches

	CA	6 D	B
K Co +	1 % = 1/200 (1 % = 1/100) X^2 = 0 P = 1,0	2 % = 4/200 (2 % = 4/200) X^2 = 0 P = 1,0	5 % = 10/200 (5 % = 10/200) X^2 = 0 P = 1,0
G Co +	2 % = 3/200 (2 % = 2/100) X^2 = 1,0 P = 0,6	1 % = 2/200 (3 % = 3/100) X^2 = 0,7 P = 0,4	4 % = 8/200 (5 % = 5/100) X^2 = 0,2 P = 0,6
PG Co +	44 % = 88/200 (56 % = 56/100) X^2 = 109 P $\ll 10^{-10}$	4 % = 8/200 (4 % = 8/200) X^2 = 1,4 P = 0,5	17 % = 34/200 (17 % = 34/200) X^2 = 15 P = 0,0001

Tabelle 6: Polioguanidin-System mit und ohne Colchizin
14 Std. nach der Inokulation von HEp-2-Zellen

CA = C-Anaphase-ähnliche Chromosomen
6D = Schwere diffuse Chromosomenveränderungen
B = Chromatidbrüche

	CA	6D	B
KCo-	9% = 9/100 X_1^2 = 0 P = 1,0 (KCo-/KCo-)	2% = 4/200 X_1^2 = 0 P = 1,0 (KCo-/KCo-)	5% = 10/200 X_1^2 = 0 P = 1,0 (KCo-/KCo-)
KCo+	1% = 1/100 X_1^2 = 6,7 P = 0,01 (KCo-/KCo+)	2% = 4/200 X_1^2 = 0 P = 1,0 (KCo-/KCo+)	5% = 10/200 X_1^2 = 0 P = 1,0 (KCo-/KCo+)
GCo-	27% = 81/300 X_1^2 = 13,9 P = 0,0002 (KCo-/GCo-)	1% = 1/100 X_1^2 = 0,44 P = 0,5 (KCo-/GCo-)	4% = 4/100 X_1^2 = 0,16 P = 0,7 (KCo-/GCo-)
GCo+	2% = 2/100 X_1^2 = 4,7 P = 0,03 (KCo-/GCo+) X_1^2 = 0,34 P = 0,6 (KCo+/GCo+) X_1^2 = 28 P = 10^{-7} (GCo-/GCo+)	3% = 3/100 X_1^2 = 0,32 P = 0,6 (KCo+/GCo+)	5% = 5/100 X_1^2 = 0 P = 1,0 (GCo+/KCo+)
PGCo-	60% = 180/300 X_1^2 = 78 P $\ll 10^{-10}$ (PGCo-/KCo-) X_1^2 = 105 P $\ll 10^{-10}$ (PGCo-/KCo+) X_1^2 = 66 P $\ll 10^{-10}$ (PGCo-/GCo-)	3% = 9/300 X_1^2 = 0,47 P = 0,5 (KCo-/PGCo-)	17% = 51/300 X_1^2 = 16 P = 5×10^{-5} (KCo-/PGCo-)
PGCo+	56% = 56/100 X_1^2 = 50 P $\ll 10^{-10}$ (PGCo+/KCo-) X_1^2 = 74 P $\ll 10^{-10}$ (PGCo+/KCo+) X_1^2 = 28 P = 10^{-7} (PGCo+/GCo-) X_1^2 = 0,50 P = 0,5 (PGCo+/PGCo-)	4% = 8/200 X_1^2 = 1,37 P = 0,25 (KCo+/PGCo+)	11% = 34/200 X_1^2 = 15 P = 10^{-4} (KCo+/PGCo+) X_1^2 = 0 P = 1,0 (PGCo-/PGCo+)

Tabelle 7: Colchizin-ähnlicher Effekt im Polioguanidin-System

VK = Chromosomenverkürzung
AU = Auseinanderweichen der Schwesterchromatiden
CA = C-Anaphase-ähnliche Chromosomen

Std. n. Inok.	K Co++			G Co++			PG Co-		
	VK	AU	CA	VK	AU	CA	VK	AU	CA
4	24 % = 47/200	64 % = 127/200	0,5 % = 1/200	8 % = 15/200	86 % = 171/200	0,5 % = 1/200	12 % = 25/200	76 % = 151/200	0,5 % = 1/200
9	6 % = 13/223	88 % = 197/223	3 % = 6/223	9 % = 19/217	84 % = 182/217	5 % = 10/217	2 % = 3/200	97 % = 194/200	62 % = 125/200
13	10 % = 20/200	90 % = 179/200	9 % = 18/200	3 % = 8/248	96 % = 237/248	9 % = 23/248	8 % = 15/200	88 % = 175/200	66 % = 131/200

Tabelle 8: Colchizin-ähnlicher Effekt von Polioguanidin: VK und AU 12 Std. nach der Inokulation von HEp-2-Zellen

	VK	AU
KCo –	47% = 47/100 X_1^2 = 0 P = 1,0 (KCo–/KCo–)	36% = 36/100 X_1^2 = 0 P = 1,0 (KCo–/KCo–)
KCo +	95% = 95/100 X_1^2 = 56 P $\ll 10^{-10}$ (KCo–/KCo+)	73% = 73/100 X_1^2 = 28 P = 10^{-7} (KCo–/KCo+)
GCo –	71% = 213/300 $X_{1_2}^2$ = 19 P = 10^{-5} (KCo–/GCo–) $X_{1_2}^2$ = 24 P = 10^{-6} (KCo+/GCo–)	65% = 65/100 $X_{1_2}^2$ = 17 P = $3x10^{-5}$ (KCo–/GCo–) $X_{1_2}^2$ = 1,5 P = 0,2 (KCo+/GCo–)
GCo +	92% = 92/100 $X_{1_2}^2$ = 48 P $\ll 10^{-10}$ (KCo–/GCo+) $X_{1_2}^2$ = 0,74 P = 0,4 (KCo+/GCo+) $X_{1_2}^2$ = 18 P = $2x10^{-5}$ (GCo–/GCo+)	87% = 174/200 $X_{1_2}^2$ = 55 P $\ll 10^{-10}$ (K– /G+) $X_{1_2}^2$ = 8,9 P = 0,0027 (K+ /G+) X_1^2 = 20 P = 10^{-5} (G– /G+)
PGCo –	94% = 94/100 $X_{1_2}^2$ = 53 P $\ll 10^{-10}$ (KCo–/PGCo–) $X_{1_2}^2$ = 0,10 P = 0,75 (KCo+/PGCo–) $X_{1_2}^2$ = 36 P = 10^{-9} (GCo–/PGCo–) X_1^2 = 0,31 P = 0,6 (GCo+/PGCo–)	92% = 92/100 $X_{1_2}^2$ = 68 P $\ll 10^{-10}$ (K– /PG–) $X_{1_2}^2$ = 12,5 P = 0,0005 (K+ /PG–) $X_{1_2}^2$ = 22 P = $3x10^{-6}$ (GCo–/PG–) X_1^2 = 1,6 P = 0,2 (G+ /PG–)
PGCo +	95% = 95/100 $X_{1_2}^2$ = 56 P $\ll 10^{-10}$ (KCo–/PGCo+) $X_{1_2}^2$ = 0 P = 1,0 (KCo+/PGCo+) $X_{1_2}^2$ = 24 P = 10^{-6} (GCo–/PGCo+) $X_{1_2}^2$ = 0,74 P = 0,4 (GCo+/PGCo+) X_1^2 = 0,10 P = 0,75 (PGCo–/PGCo+)	93% = 93/100 $X_{1_2}^2$ = 71 P $\ll 10^{-10}$ (K– /PG+) $X_{1_2}^2$ = 14 P = 0,0002 (K+ /PG+) $X_{1_2}^2$ = 24 P = 10^{-6} (G– /PG+) $X_{1_2}^2$ = 2,4 P = 0,1 (G+ /PG+) X_1^2 = 0,07 P = 0,8 (PG– /PG+)

Tabelle 9: Spontane Endoreduplikationen in HEp-2-Zellen

K = Kontrollen
G = Guanidin-behandelt
PG = Polioguanidin-inokuliert

	8 Std.	27 Std.
K	2 ‰ = 20/1013 X^2 = 0 P = 1,0 (K_1/K_1)	3 ‰ = 7/2562 X^2 = 101 P $\ll 10^{-10}$ (S_1/S_2) X^2 = 26 P = 2×10^{-7} (K_1/K_2)
G	8 ‰ = 59/736 X^2 = 36 P = 10^{-9} (K_1/G_1)	3 ‰ = 3/1172 X^2 = 0,06 P = 0,8 (K_2/G_2) X^2 = 84 P $\ll 10^{-10}$ (G_1/G_2)
PG	9 ‰ = 7/736 X^2 = 2,3 P = 0,13 (K_1/PG_1) X^2 = 21 P = 5×10^{-6} (G_1/PG_1)	0 = 0/23 X^2 = 3,1 P = 0,08 (K_2/PG_2) X^2 = 3,4 P = 0,08 (G_2/PG_2) X^2 = 0,4 P = 0,5 (PG_1/PG_2)

Tabelle 10: Wirkung von Enzymen auf Chromosomen

f = fixierte Chromosomen, i = isolierte Chromosomen
Konzentrationen (µg/ml), die zu Chromosomenveränderungen führen, sind unterstrichen

DNase pH 7		DNase pH 5		RNase pH 7		Trypsin pH 7		Papain pH 3,65		Collagenase pH 5		Pronase pH 5		Phosphatase pH 5		Muramidase pH 5	
f	i	f	i	f	i	f	i	f	i	f	i	f	i	f	i	f	i
										3000	3000				2000		2000
										1500	1500						
						1000		1000	1000	1000	1000	1000	1000				
						700				700							
								500	500	500	500	500		500		500	
						400	400										
										250	250		250	250		250	
				200								200	200				
140				140													
						100	100	100	100	100	100	100	100	100		100	
80				80													
	50					50	50	50	50	50	50	50	50	50		50	
		40															
								30*				30					
	25										25			25		25	
20			20	20					20			20					
10	10	10	10	10		10	10	10*		10		10		10		10	
								10	10								
								6*									
5	5	5	5			5		5	5	5		5		5		5	
2		2															
	1	1				1		1*	1	1		1					
								1	1								
0,5	0,5	0,5				0,5		0,5*									
								0,5	0,5								
0,25		0,25						0,25*	0,25								
		0,1				0,1		0,1*									
								0,1	0,1								
0,05																	
0,02																	

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

ADZHIGHITOV, F.I., DZEMILEV, Z.A., and KOSICHENKO, L.P., transformation of monkey embryo tissue cultures by Carr-strain of Rous-virus, Vop.Virus, 12, 439-445 (1967).

AHLSTRÖM, C.G., KATO, R., and LEVAN, A., Rous sarcoma in chinese hamsters, Science, 144, 1232-1233 (1964).

ALEKPEROV, U.K., and SHCHERBAKOV, V.K., the problem of nucleus and cytoplasm correlation and cell aneuploidy at the diploid or polyploid level, Dokl. Akad. Nauk SSSR, 175, 1382-1384 (1967).

ALFERT, M., and GESCHWIND, I.I., a selective staining method for the basic proteins of cell nuclei, Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.), 53, 991-999 (1953).

ALLFREY, V.G., and MIRSKY, A.E., mechanisms of synthesis and control of protein and ribonucleic acid synthesis in the cell nucleus, Cold Spr.Harb.Symp.quant.Biol., 28, 247-262 (1963).

-- , POGO, B.G.T., LITTAU, V.C., GERSHEY, E.L. and MIRSKY, A.E., histone acetylation in insect chromosomes, Science, 159, 314-316 (1968).

ALLISON, A.C., and PATON, G.R., chromosome damage in human diploid cells following activation of lysosomal enzymes, Nature (Lond.), 207, 1170-1173 (1965).

-- , and MALUCCI, L., lysosomes in dividing cells, with special reference to lymphocytes, Lancet, (1964-II), 1371-1373.

-- , lysosomes and disease, Scientific Am., 217-5, 62-67 (1967).

AMATO, F. D', the chromosome breaking activity of chemicals as studied by the Allium cepa test, Pub. Stat. Zool. Napoli, 22, 158-170 (1950).

-- , further investigations on the mutagenic activity of acridine, Caryologica, 4, 388-413 (1952).

AMMERMANN, D., Synthese und Abbau der Nukleinsäure während der Entwicklung des Makronukleus von Stylonchia mytilus (Protozoa, Ciliata), Chromosoma (Berl.), 25, 107-120 (1968).

APPELMANS, F., WATTIAUX, R., and DE DUVE, C., tissue fractionation studies, 5.the association of acid phosphotase with a special class of cytoplasmic granules in rat liver, ~~Exp. Cell Res.~~, Biochem.J., 59, 438-445 (1955).

ARRIGHI, F.E., and HSU, T.C., experimental alteration of metaphase chromosome morphology, effect of actinomycin D, Exp. Cell Res., 39, 305-308 (1965).

+ AULA, P., chromosome breaks in leukocytes of chickenpox patients, Hereditas (Lund), 49, 451-453 (1963).

-- , chromosomes and viral infections, Lancet, (1964-I), 720-721.

+ AULA, P., virus associated chromosome breakage, a cytogenetic study of chickenpox, measles and mumps patients and of cell-cultures infected with measles virus, Suomal. Tiedeakat., Toim. A IV, Biologica, 1-75 (1965).

-- , and SAKSELA, E., early morphology of the chromosome damage induced by Sendai virus, Hereditas (Lund), 55, 362-366 (1966).

-- , and NICHOLS, W.W., lysosomes and virus-induced chromosome breakage, Exp. Cell Res., 51, 595-601 (1968).

-- , and -- , the cytogenetic effect of mycoplasma in human leukocyte cultures, J.Cell Physiol.,70,281-290, (1967).

+ AYA, T., and MAKINO, S., notes on chromosome abnormalities in cultured leukocytes from serum hepatitis patients, Proc. Jap.Acad., 42, 648-653 (1966).

-- , -- , and YAMADA, M., chromosome aberrations induced in cultured human leukocytes by herpes simplex virus infection, Proc.Jap.Acad., 43, 239-244 (1967).

BABLANIAN, R., EGGERS, H.J., and TAMM, I., studies on the mechanism of poliovirus induced cell damage, 1.the relation between poliovirus induced metabolic and morphological alterations in cultured cells, Virology, 26, 100-113 (1965).

-- , -- , and -- , studies on the mechanism of poliovirus induced cell damage, 2.the relation between poliovirus-growth and virus induced morphological changes in the cells, Virology, 26, 114-121 (1965).

BALTIMORE, D., FRANKLIN, R.M., and CALLENDER, J., mengo-virus induced inhibition of host ribonucleic acid and protein synthesis, Biochim.biophys.Acta (Amst.), 76, 425-430 (1963).

+ BARINSKY, L.F., and DEMENTIEV, I.V., virological and cytogenetic studies on the involvement of bone marrow of mice in some hepatoencephalotropic viral infections, Acta virol. (Bratislava), 12, 464-467 (1968).

BARSKI, G., et CORNEFERT, F., caractéristiques caryologiques des tumeurs pulmonaires de hamster produites par le adènovirus 12, Ann. Inst. Pasteur, 107, 114-120 (1964).

+ BARTSCH, H.D., HABERMEHL, K.-O., and DIEFENTHAL, W., chromosomal damage after infection with poliomyelitisvirus, Exp. Cell Res., 48, 671-675 (1967).

-- , -- , and -- , correlation between poliomyelitisvirus-reproductioncycle, chromosomal alterations and lysosomal enzymes, Arch.ges.Virusforsch., 27, 115-127 (1969).

BASTIA, D., and SWAMINATHAN, M.S., ultrastructure of interphase chromosomes, Exp. Cell Res., 48, 18-26 (1967).

BAUCHINGER, M., Chromosomenaberrationen und ihre zeitliche Veränderung nach Radium-Röntgentherapie gynäkologischer Tumoren, Strahlentherapie, 135, 553-564 (1968).

+ BAUGHMAN, F.A.jr., HIRSCH, B., and BENDA, C.E., chromosomes in Crebé's syndrome, Lancet, (1964-I), 101.

BAUMANN, G., zur Wirkung des Juvenilhormons: elektrophysiologische Messungen an der Zellmembran der Speicheldrüse von Galleria mellonella, J.Insect.Physiol., 14, 1459-1576 (1968).

BAUMILLER, R.C., virus induced point mutation, Nature (Lond.), 214, 806-807 (1967).

BECKHOR, I., KUNG, G.M., and BONNER, J., sequence-specific interaction of DNA and chromosomal protein, J.Mol.Biol., 39, 351-364 (1969).

BEERMANN, S., a quantitative study of chromosome diminution in embryonic mitoses of Cyclops furcifer, Genetics, 54, 567-576 (1966).

BEERMANN, W., Riesenchromosomen, Protoplasmatologia, Bd. VI / D, Springer-Verlag, Wien (1962).

+ BENYESH-MELNICK, M., STICH, H.F., RAPP, F., and HSU, T.C., viruses and mammalian chromosomes, 3.effect of herpes zoster virus on human embryonal lung cells, Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.), 117, 546-549 (1964).

BERENDES, H.D., and KEYL, H.-G., distribution of DNA in heterochromatin and euchromatin of polytene nuclei of Drosophila hydei, Genetics, 57, 1-13 (1967).

BESTE, H. Den, FJELDE, A., JACKSON, J.L., ANDRESEN, W.F., KERR, H. A., and EVANS, V.J., adaption,growth and analysis of HEp-2 cells in chemically defined medium, J.nat.Cancer Inst., 36, 1075-1088 (1966).

BIER, K., Endomitose und Polytänie in den Nährzell-kernen von Calliphora erythrocephala Meigen, Chromosoma (Berl.), 8, 493-522 (1957).

-- , KUNZ, W, and RIBERT, D., Struktur und Funktion der Oocytenchromosomen und Nukleolen sowie der Extra-DNS während der Oogenese panoistischer und meroistischer Insekten, Chromosoma (Berl.), 23, 214-254 (1967).

BLACK, P.S., ROWE, W.P., and COOPER, H.L., an analysis of SV 40 induced transformation of hamster kidney tissue in vitro, 2. studies of three clones derived from a continuous cell line of transformed cells, Proc.nat.Acad.Sci.(Wash.), 50, 847-854 (1963).

BOGDANOV, Y.F., LIAPUNOVA, N.A., SHERUDILO, A.I., and ANTROPOVA, E.N., uncoupling of DNA and histone synthesis prior to prophase I of meiosis in the cricket Grillus (Acheta) domesticus (L.), Exp.Cell Res., 52, 59-70 (1968).

+ BOIRON, M., TANZER, J., THOMAS, M., and HAMPE, A., early diffuse chromosome alterations in monkey kidney cells infected in vitro with herpes simplex virus, Nature (Lond.), 209, 737-738 (1966).

-- , THOMAS, M., PERIES, J., and BERNARD, C., conversions cellulaires produites in vitro par le virus de sarcome de Moloney, Nouv.Rev.franc.Hémat., 7, 625-652 (1967).

+ BONNEVOL, C., études de cellules KB infectées par les myxovirus parainfluenzae II, III ou par le virus respiratoire syncytial: 1.rapport entre la multiplication virale et ses manifestations cellulaires, Ann. Inst. Pasteur, 110, 675-687 (1966).

+ BONISSOL, C., études de cellules KB infectées par les myxovirus parainfluenzae II, III ou par le virus respiratoire syncytial: 2.études cytochémiques, Ann. Inst. Pasteur, 111, 265-281 (1966).

BONNER, J., DAHMUS, M.E., FAMBROUGH, D., HUANG, R.C., MARUSHIGE, K., and TUAN, D.Y.H., the biology of isolated chromatin, 159Science, 159, 47-56 (1968).

BORENFREUND, E., KRIM,M., SANDERS, K.F., STERNBERG, S.S., and BENDICH, A, malignant conversiom of cells in vitro by carcinogens and viruses, Proc.nat.Acad.Sci.(Wash.), 56, 672-679 (1966).

BORISY, G.G., and TAYLOR, E.W., the mechanism of action of colchicine, binding of colchicine-3H to cellular protein, J. Cell Biol., 34, 525-533 (1967).

+ BOUé, A., PLOTKIN, S.A., MOORHEAD, P.S., et BOUé, J.-G., action du virus de la rubéole sur differents systèmes de cultures de cellules embryonnaires humaines, Arch.ges.Virusforsch., 16, 443-458 (1965).

-- , HANNOUN, C., BOUé, J.-G., and PLOTKIN, S.A., cytological, virological and chromosomal studies of cell strains from aborted fetuses, Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.), 122, 11-16 (1966).

-- , et BOUé, J.-G., virus et chromosomes humains, Path.Biol. (Paris), 16, 677-690 (1968).

+ BOUé, J.G., BOUé, A., MOORHEAD, P.S., et PLOTKIN, S.A., altérations chromosomiques induites par le virus de la rubéole dans les cellules embryonnaires, C.R.Acad.Sci.(Paris), Sér. D, 259, 687-690 (1964).

-- , BOUé, A., et LAZAR, P., altérations chromosomiques induites par le virus de la rubéole et par le virus de la rougeole, dans les cellules diploides humaines cultivées in vitro, Path.Biol. (Paris), 15, 997-1007 (1967).

-- , -- , MONTAGNIER, L., et VIGIER, Ph., évolution chromosomique d'un clone de cellules humaines transformées par le virus du sarcome de Rous, C.R.Acad.Sci. (Paris), Sér. D., 266, 178-181 (1968).

BRACHET, J., biochemical cytology, Academic Press Inc., N.Y., p.465 (1957).

-- , DECROLEZ-BRIERS, M., and HOYEZ, J., contribution à l'étude des lysosomes au cours du développement embryonnaires, Bull.Soc.Chim.biol.(Paris), 40, 2039-2048 (1958).

BRAILOWSKI, C., WICKER, R., SUAREZ, H., et CASSINGENA, R., transformation 'in vitro' de cellules de hamster chinois par l'adénovirus 12: étude cytogénétique, Int. J. Cancer, 2, 133 (1967),

BRANDES, D., SLOAN, K.W., ANTON, E., and BLOEDORN, F., the effect of X-irradiation on the lysosomes of the mouse, Cancer Res., 27, 741-746 (1967).

BUECHER, A.L., and PUGATCH, R.D., a non-dialyzable inhibitor of proteolytic activity in soluble extracts of Escherichia coli, Experientia (Basel), 25, 251-252 (1969).

+ BURDETTE, W.J., and YOON, J.S., mutations, chromosomal aberrations and tumours in insects with oncogenic viruses, Science, 155, 340-341 (1967).

-- , -- , and MUKERJEE, D. chromosomal effects of oncogenic virus, Proc.Am.Assoc.Cancer Res., 9, No. 38,(1968).

BÜRKI, K., FISCHER, K., und FEY, H., vergleichend virologische, fluoreszenzserologische und cytologische Untersuchungen mit einem bovinem Parainfluenza-3 Virus, Zbl. Bakt., I. Abt. Orig., 200, 191-201 (1966).

+ CANTELL, K., SAKSELA, E., and AULA, P., virological studies on chromosome damage of HeLa cells induced by myxoviruses Ann.Med.exp.Biol.Fenn., 44, 255-259 (1966).

CANTOR, K.P., and HEARST, J.E., isolation and partial characterisation of metaphase chromosomes of a mouse ascites tumor, Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.), 55, 642-649 (1966).

CARNIEL, K., das Verhalten der Kerne im Tapetum der Angiospermen mit besonderer Berücksichtigung der Endomitosen und sogenannten Endomitosen, Öst.bot.Z., 99, 318-362 (1952).

CASPARY, E.A., and SEWELL, F.M., histone-acetylation in scrapie-affected mouse brain, Experientia (Basel), 24, 793-794 (1968).

CASSINGENA, R., et TOURNIER, P., interaction adénovirus 12 -cellules de Mesocricetus auratus, 1.étude chromosomique, Ann. Inst.Pasteur, 108, 277-297 (1965).

+ -- , et WICKER, R., interaction adénovirus 12-cellules de mesocricetus auratus, 2.délétion d'un chromosome sexuel, Ann.Inst,Pasteur, 110, 655-674 (1966).

CATCHESIDE, D.G., and HOLMES, B., Symp. Soc. Biol., 1, 225 (1947).

CECCARELLI, G., and TORBIDONI, L., viral hepatitis and Down's syndrome, Lancet, (1967-I), 438.

+ CHANG, T.H., MOORHEAD, P.S., BOUé, J.G., PLOTKIN,S.A., and HUSKINS, J.M., chromosome studies on human cells infected in utero and in vivo with rubella virus, Proc.Soc.exp. Biol. (N.Y.), 122, 236-243 (1966).

CHERNICK, B, EVANS, A., and DAVIDSON, L., the effect of hypotonic treatment and fixation on retention of chromosomal protein in air-dried preparations, Canad.J.Genet.Cytol., 10, 767 (1968).

CHIANG, K.-S., and SUEOKA, N., replication of chromosomal and cytoplasmic DNA during mitosis and meiosis in the eukaryote Chlamydomonad reinhardi, J.cell.Physiol., 70, suppl.1, 89-112 (1967).

+ CHUN, T., ALEXANDER, D.S., HAUST, M.D., and BRYANS, A.M., cytogenetic studies on children with virus infections, Hum. Chromosome Newsl., 16, 7-8 (1965).

-- , -- , Bryans, A.M., and HAUST, M.D., chromosomal studies in children with mumps, chickenpox, measles and measles vaccination, Canad.med.Ass.J., 94, 126-129 (1966).

+ COHEN, M.M., and SHAW, M.W., specific effects of viruses and antimetabolites on mammalian chromosomes, in: YERGANIAN, G., the chromosome, Symp., p.50-66 (1965).

COMINGS, D.E., the rationale for an ordered arrangement of chromatin in the interphase nucleus, Am.J.hum.Genet., 20, 440-460 (1968).

CONEN, P.E., ERKMAN, B., and METATOXOU, C., chromosomal abnormalities in childhood leukemia, Proc.Am.Ass.Cancer Res., 8, No. 10, (1967).

COOPER, H.L., and BLACK, P.H., cytogenetic studies of hamster kidney cell cultures transformed by the SV 40, J.nat. Cancer Inst., 30, 1015-1043 (1963).

-- , cytogenetic studies of three clones derived from a permanent line of hamster cells transformed by sV 40, J.cell.comp.Physiol., 64, 201-220 (1964).

+ COOPER, J.E.K., YOHN,D.S., and STICH, H.F., viruses and mammalian chromosomes. 10.comparative studies of the chromosome damage induced by human and simian adeno viruses, Exp. Cell Res., 53, 225-240 (1968).

CRISTOFALO, V.J., KABAKJIAN, J.R., and KRITCHEVSKY, D., enzyme activities of some cultured human cells, Proc.Soc.exp. Biol. (N.Y.), 126, 273-276 (1967).

-- , -- , and -- ,heterogeneity of acid phosphatase in the human diploid cell strain WI-38, Proc.Soc.exp.Bio. (N.Y.), 126, 649-653(1967).

CROSSLEY, A.C., the fine structure and mechanism of break-down of larval intersegmental muscles in the blowfly Calliphora erythrocephala, J.Insect Physiol., 14, 1389-1407 (1968).

DA CUNHA, A.B., MORGANTE, J.S., PAVAN, C., and GARIDO, M.C., studies on cytology and differentiation in Sciaridae: chromosome changes induced by gregarine in a Trichosia sp.(Diptera, Sciaridae), Caryologia, 21, 271-282 (1968).

DARLINGTON, C.D., and KOLLER, P.C., chromosome breakage and the nucleic acid cycle, J.Genet., 46, 180-267 (1945).

-- , and -- , the chemical breakage of chromosomes, Heredity, 1, 187-221 (1947).

DE DUVE, C., GIANETTO, R., APPELMANS, F., and WATTIAUX, R., enzymic content of the mitochondria fraction, Nature(Lond.), 172, 1143-1144 (1953).

DEFENDI, V.,and LEHMAN, J.M., transformation of hamster embryo cells in vitro by polyoma virus: morphological, karyological, immunological and transplantation characteristiques, J.cell.comp.Physiol., 66, 351-409 (1965).

DE GROUCHY, J., DENARA, C., BILSKI, PASQUIER, G., ZITTOUN, R., et BERNADON, A., endoréplication sélective d'un chromosome surnuméraire dans un cas de myélome multiple, Ann. Génét., 10, 43-45 (1967).

+ -- , TUDELA,V.,et FEINGOLD,J., études cytogénétiques in vivo et in vitro après infections virales et après vaccination, anti-amarile, Path.Biol.,15,19-20 (1967).

DESAI, L., and TENCER, R., effects of histones and polylysine on the synthetic activity of the giant chromosomes of salivar-glands in Dipteran larvae, Exp. Cell Res., 52, 185-197 (1968).

+ DIAZ, M., and PAVAN, C., changes in chromosomes induced by micro-organism infections, Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.),54, 1321-1327 (1965).

DICK, C., and JOHNS, E.W., the effect of two acetic acid containing fixatives on the histone content of calf thymus de-oxyribonucleoprotein and calf thymus tissue, Exp.Cell Res., 51, 626-632 (1968).

DIEFENTHAL, W., und HABERMEHL, K.-O., Vorrichtung zur Einstellung eines bestimmten Kohlensäure-Luftgemisches für Mono-layer Gewebekulturen in Petrischalen, Zbl.Bakt., I.Abt. Orig., 185, 11-13 (1962).

-- , und -- ,,morphologische Veränderungen virus-infizierter Zellen, Berl.Med., 13, 185-190(1962).

+ DIPAOLO, J.A., RABSON, A.S., and MALMGREN, R.A., in vitro viral transformation in chemically transformed cells, J.nat. Cancer Inst., 40, 757-770 (1968).

DOERFLER, W., the fate of the DNA of the adenovirus type 12 in baby hamster kidney cells, Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.), 60, 636-643 (1968).

DOERNER, K.jr., pressure radients in cells, J.theor.Biol., 14, 284-292 (1967).

DULBECCO, R., and VOGT. M., plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis-viruses, J.exp.Med., 99, 167-182 (1954).

DUTT, M.K., and KAUFMANN, B.P., Nucleus 5, 85 (1959).

EGGERS, H.J., and TAMM, I., synergistic effect of 2-(alpha-Hydrobenzyl)-benzimidazole and guanidine on Picorna-virus reproduction, Nature (Lond.), 199, 513-514(1963).

EIGSTI, O.J., and DUSTIN, P.jr., colchicine, Ames (1957).

+ EL-ALFI, O.S., SMITH, P.M., and BIESELE, J.J., chromosomal breaks in human leukocyte cultures induced by an agent in the plasma of infectious hepatitis patients, Hereditas (Lund), 52, 285-294 (1965).

ELENS, A., and WATTIAUX, R., age-correlated changes in lysosomal enzyme activities: an index of ageing?, Exp.Geront., 4, 131-135 (1969).

ENGEL, W., KRONE, W., und WOLF,U., die Wirkung von Thioguanin, Hydroxylamin und 5-Bromdesoxyuridin auf menschliche Chromosomen in vitro, Mutation Res., 4, 353-368 (1967).

FICQ, A., and URBANI, E, cytochemical studies on the oogenesis of Dytiscus marginalis (L.), Exp.Cell Res., 55, 243-247 (1969),

FJELDE, A., and HOLTERMANN, O.A., chromosome studies in HEp-2 tissue culture cell line during infection with measles virus, Life Sciences, 12, 683-692 (1962).

-- , LEVAN, A., and RASK-NIELSEN, R., the chromosomes of four transplatable murine plasma cell leukemias charac-

terised by varying pathological serum protein changes and/or amyloid formation, Hereditas (Lund), 48, 630-644 (1962).

FOGH, J., and FOGH, H., chromosome changes in PPLO-infected FL-human amnion cells, Proc.Soc.exp.Biol.(N.Y.), 119, 233-238 (1965).

-- , and -- , irreversibility of major chromosome change in mycoplasma modified line of FL human amnion cells, Proc.Soc.exp.Biol.(N.Y.), 126, 67-74 (1967).

FROLOVA, S.L., study of fine chromosome structure under enzyme treatment, J.Hered., 35, 235-246 (1944).

GALL, J.G., MAC GREGOR, H.C., and KIDSTON, M.E., gene amplification in the oocytes of Dytiscid water beetles, Chromosoma (Berl.), 26, 169-187 (1969).

GEBHART, E., Untersuchungen über die Wirkung von 8-Hydrychinoliniumsulfat auf menschliche Chromosomen in vitro, Mutation Res., 6, 309-318 (1968).

GEITLER, L., das Wachstum der Zellkerne in tierischen und pflanzlichen Geweben, Ergebn.Biol., 18, 1-54 (1941).

-- , Ergebnisse und Probleme der Endomitoseforschung, Öst. bot.Z., 95, 277-299 (1948).

-- , Morphologie und Entwicklungsgeschichte der Zelle, Fortschritte Bot., 13, 1-22 (1951).

-- , Endomitose und endomitotische Polyploidisierung, Protoplasmatologia, Bd. VI/C, Springer-Verlag, Wien (1953).

GENEST, P., et DANIEL, Ph, analyse chromosomique de cellules KB et de cellules KB-EA chroniquement infectées par le virus parainfluenzae type 3, C.R.Acad.Sci.(Paris), Sér. D, 259, 2567-2570 (1964).

-- , and -- , genomic modifications in cell line cultures chronically infected with a myxovirus, Proc.Soc. exp.Biol. (N.Y.), 123, 722-725 (1966).

GREENBAUM, A.L., SLATER, T.F., and WANG, T.Y., lysosomal enzyme changes in enforced mammary-gland involution, Biochem.J., 97, 518-522 (1965).

+ GRIPENBERG, U., chromosome studies in some virus infections, Hereditas (Lund), 54, 1-18 (1965).

+ GROVER, S., SOLANKI, B.K., KHANDELWAL, M.K., and JAISWAL, R.B., chromosomal abnormalities in measles, Indian Pediat., 5, 326-329 (1968).

GULUBOV, A., and ATZEV, S., cytological and cytochemical studies on dynamics of CPE of Sendai virus, Dokl.Bolgar.Akad. Nauk., 19, 1099-1101 (1966).

HABERMEHL, K.-O., und DIEFENTHAL, W., der Einfluß der Virusinfektion auf den Ablauf der Zellteilung, Zbl.Bakt., I.Abt.Orig., 199, 274-314 (1966).

-- , the influence of virus infections on cell division, IX. Int.Congr.Microbiol., Moscow, Focal Topic E2 (1966).

HABERMEHL, K.-O., DIEFENTHAL, R., und DIEFENTHAL, W., Nachweis eines Colchizin-ähnlichen Effektes in Poliomyelitis-infizierten Gewebekulturzellen nach Unterbrechung der Virusreproduktion durch Guanidin, Arch.ges.Virusforsch., 26, 138-148 (1969).

HALKKA, O., chromosome breakage associated with infection, 1-phase contrast microscopy, Hereditas (Lund), 58, 248-252(1967).

-- , and HEINONEN, L., chromosome breakage associated with infection, 2.stained sect ions, Hereditas (Lund), 58, 253-261 (1967).

HAMMAR, B., difference in heterochromatin between some avian species, Hereditas (Lund), 57, 209-216 (1967).

+ HAMPAR, B., and ELLISON, S.A., chromosomal aberrations induced by an animal virus, Nature (Lond.),192, 145-147 (1961).

-- , and -- , cellular alteration in the MCH line of chinese hamsters cells following infection with herpes simplex virus, Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.), 49, 474-480 (1963).

HARBERS, E., die Nukleinsäuren, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart(1964), S. 133-135.

+ HARNDEN, D.G., cytogenetic studies on patients with virus infections and subjects vaccinated against yellow fewer, Am. J.hum.Genet., 16, 204-213 (1964).

HARRIS, J.W., studies of irradiated lysosomes with particular reference to the action of Calcium, Exp. Cell Res., 45, 487-506 (1967).

-- , binding of sulfhydryl reagents to normal and irradiated leukocyte lysosomes, Aust.J.exp.Biol.med.Sci., 46, 209-217 (1968).

HASSAN, G., e Bertolini,B., sul compartomento dei lisosomi del fegato in alcune alterazioni del metabolismo dei pigmenti biliari, Atti Acad.,naz.Lincei, 40, 126-130 (1966).

HAYFLICK, L., and MOORHEAD, P.S., the establishment of a line (WISH) of human amnion cells in continuous cultivation, Exp. Cell Res., 25, 585-621 (1961).

HEBERT, S., et VERNE, J., les lysosomes dans les hépatocytes en culture, Bull.Ass.Anat.(Nancy), Nr.138, 645-649 (1967).

HEITZ, E., über alpha- und beta-Heterochromatin sowie Konstanz und Bau der Chromosomen bei Drosophila, Biol.Zbl., 54, 588-609 (1934).

-- ,kleine Beiträge zur Zellenlehre, 2.über die Riesenkerne der Schnecken und Asseln, Rev.suisse Zool., 51, 402-409 (1944).

HILGARTNER, C.A., the binding of DNA to residual protein in mammalian nuclei, Exp.Cell Res., 49, 520-532 (1968).

HIRSCHHORN, K., and HIRSCHHORN, L., role of lysosomes in the lymphocyte resonse, Lancet, (1965-I), 1046-1047.

HOMMA, M., OHIRA, M., and ISHIDA, N., specific chromosome aberrations in cells persistently infected with type 2 hemadsorption virus, Virology, 34, 60-68 (1968).

+ HUANG, C.C., induction of high incidence of damage of the X-chromosome of Rattus TMastomys) natalensis by base analogues, viruses and carcinogens, Chromosoma (Berl.), 23, 162-179 (1967).

HUANG, R.C., and HUANG, P.C., effect of protein-bound RNA associated with chick embryo chromatin on template specifity of the chromatin, J.Mol.Biol., 39, 365-378 (1969).

HUBERMAN, J.A., and RIGGS, A.D., on the mechanism of DNA replication in mammalian chromosomes, J.Mol.Biol., 32, 327-341(1968).

HUSKINS, C.L., the coiling of chromonemata, Cold Spr.Harb.Symp.quant. Biol., 9, 13-18 (1941).

IRLIN, I.S., mekhanizmy virusnogo kantserogeneza, Biologija zlochestvenogo rosta : Nauka : Moscow, 13-57 (1965).

JONEJA, M.G., and STICH, H.F., chromosome aberrations in virus-induced murine leukemia, Exp.Cell Res., 40, 148-151(1965).

JURAND, A., SIMOES, L.C.G., and PAVAN, C., changes in the ultrastructure of salivary gland cytoplasma in Sciara ocellaris (Comstock)(1882) due to microsporadian infection, J.Insect. physiol., 13, 795-804 (1967).

KALCKAR, J.,J.biol.Chem., 167, 461 (1947).

KARLSON, P., kurzes Lehrbuch der Biochemie, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, 4.Aufl., (1964).

+ KATO, H., and SANDBERG, A.A., chromosome pulverization in chinese hamster cells induced by Sendai virus, J.nat.Cancer Inst., 41, 1117-1123 (1968).

-- , and -- , cellular phase of chromosome pulverization induced by Sendai virus, J.nat.Cancer Inst., 41, 1125-1131 (1968).

KATO, R., LEVAN, A., and NICHOLS, W.W., chromosomal changes in Rous tumours in rodents, Unio Nord.contra Cancer, Symp.Virus and Cancer, Saltsjöbaden, Sweden, June 8-9, (1964), p. 75-94.

+ -- , localization of spontaneous and RSV-induced breakage in cific regions of the chromosomes of the chinese hamster, Hereditas (Lund), 58, 220-247 (1967).

-- , the chromosomes of 42 primary Rous sarcomas of the chinese hamster, Hereditas (Lund), 59, 63-119 (1968).

KAUFMANN, B.P., and MAC DONALD, M.R., organization of the chromosome, Cold Spr.Harb.Symp.quant.Biol.,21, 233-246 (1956).

+ KAUL, B.L., a study of meiosis in virus-infected Datura quarcifolia, Cytologia (Tokyo), 33, 17-20 (1968).

KEAST, D., karyotype studies on lymphoma (2731/L) resulting from reovirus type 3 infection of neonatal mice, Exp. Cell Res., 44, 295-302 (1966).

+ KERKIS, J.J., SABLINA, O.V., RADJABLI, S.I., and BOCHAROV, E.F., an investigation of chromosomal abnormalities in peripheral blood leukocytes of patients affected by acute viral hepatitis, Genetika (Leningrado), 5, 85-94 (1967).

KEYL, H.G., and HAGELE, K., Heterochromatin-proliferation an den Speicheldrüsenchromosomen von Chironomus melanotus, Chromosoma (Berl.), 19, 223-230 (1966).

KLEIN, M., and HARPAZ, I., the effect of infection with maize rough dwarf virus (MRDV) upon the proteolytic activity in maize plants, Phytopath.Z., 62, 279-284 (1968).

KLEINFELD, R.G., and SISKEN, J.E., morphological and kinetic aspects of mitotic arrest by and recovery from colcemide, J. Cell Biol., 31, 369-380 (1966).

KOGON, A., KRONMAL, R., and PETERSON, D.R., viral hepatitis and Down's syndrome, Lancet, (1967-I), 615.

KOMNICK, H., und WOHLFARTH-BOTTERMANN, K.E., Lysosomen (Cytosomen), aus: Fortschr.Zool., 17, 104-114 (1966).

KOPITAR, M., COTIC, V., TURK, V.,and LEBEZ, D., effect of gamma rays on the proteolytic activity of in vitro irradiated blood cells, 2.effect on lymphocyte cells, Strahlentherapie, 136, 496-499 (1968).

-- , -- , -- , and -- , effect of gamma rays on the proteolytic activity of in vitro irradiated blood cells, 3.effect on total leukocytes, Strahlentherapie, 136, 621-625 (1968).

KOPROWSKI, J., PONTEN, J.A., JENSEN, F., RAVDIN, R.G., MOORHEAD, P.S., and SAKSELA, E., transformation of cultures of human tissue infected with SV 40, J.cell.comp.Physiol., 59, 281-292 (1962).

KRISCH, K., Lysosomen, Dtsch.med.Wschr., 91, 1274-1280 (1966).

KROEGER, H., experiments on the extra nuclear control of gene activity in dipteran polytene chromosomes, J.cell.comp. Physiol., 62, suppl. 1, 45-49 (1963).

--, ,chemical nature of the system controlling gene activity in insect cells, Nature (Lond.), 200, 1234-1235(1963).

-- , zellphysiologische Mechanismen bei der Regulation der Genaktivität in den Riesenchromosomen von Chironomus thummi, Chromosoma (Berl.), 15, 36-70 (1964).

-- , hormones, ion balances and gene activity in dipteran chromosomes, Mem.Soc.Endocrinol.,15, 55-66 (1966).

-- , Potentialdifferenz und Puff-Muster; elektrophysiologische und cytologische Untersuchungen an den Speicheldrüsen von Chironomus thummi, Exp.Cell Res., 41, 64-80 (1966).

KUMAR, S., and NATARAJAN, A.T., the mechanism of the effect of post-irradiation centrifugation on the yield and the kinetics of radiation induced chromosome aberrations in barley, Genetics, 53, 1065-1069 (1966).

KUNZ, W., die Entstehung multipler Oocytennucleolen aus akzessorischen DNS-Körpern bei Gryllus domesticus, Chromosoma (Berl.), 26, 41-75 (1969).

+ KUROKI, Y., MAKINO, S., AYA, T., and NAYAGAMA, T., chromosome abnormalities in cultured leukocytes from rubella patients, Jap.J.hum.Genet., 11, 17-23 (1966).

LAWRENCE, S.A., MASS, R.E., and SIEGEL, B.V., cytochemical demonstration of acid phosphatase in peripheral blood cells in Rauscher virus infection, Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.), 129, 175-179 (1968).

LAYNE, E., spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins, Methods in Enzymology, v.III, Academic Press, London -N.Y., p.447-454 (1951).

LEA, D.E., action of radiation on living cells, 2nd. ed., Cambridge University Press, (1965).

+ LEAO, J., NOVACK, A.H., NEU, R.L., SCHLEGEL, R.J., and GARDNER, L.I., chromosomes after measles vaccine, Lancet, (1966-II),345-346.

LECK, I., incidence and epidemicity of Down's syndrome, Lancet, (1966-II), 457-460.

LEUCHTENBERGER, C., a cytochemical study of pycnotic nuclear degeneration, Chromosoma (Berl.), 3, 449-473 (1950).

-- , LEUCHTENBERGER, R., BRUNNER, T., NORLIN, D., and WEISS, S., transformation induced by PR6 influenza virus in primary cultures of mouse kidney and bronchus and production of malignant kidney tumours in mice by subcultivation, Proc. nat.Acad.Sci. (Wash.), 53, 694-701 (1965).

LEVAN, A., the effect of colchicine on root mitosis in Allium, Hereditas (Lund), 24, 471-486 (1938).

-- , and TJIO, J.H. , induction of chromosome fragmentation by phenols, Hereditas (Lund), 34, 453-484 (1948).

LEVINE, A.S., NESBIT, M.E., WHITE, J.G., and YARBRO, J.W., effect of fractionated histones on nucleic acid synthesis in 6C3HED mouse ascites tumor cells and in the normal spleen cells, Cancer Res., 28, 831-844 (1968).

LEZZI, M., die Wirkung von DNase auf isolierte Polytänchromosomen, Exp.Cell Res., 39, 289-292 (1965).

-- , Induktion eines Ecdyson-aktivierbaren Puffs in isolierten Zellkernen von Chironomus durch KCl, Exp. Cell Res., 43, 571-577 (1966).

-- , RNS- und Proteinsynthese in Puffs isolierter Speicheldrüsenchromosomen von Chironomus, Chromosoma (Berl.), 21, 72-88 (1967).

-- , cytochemische Untersuchungen an Puffs isolierter Speicheldrüsenchromosomen von Chironomus, Chromosoma (Berl.), 21, 89-108 (1967).

-- , spezifische Aktivitätssteigerung eines Balbianiringes durch Mg++ in isolierten Zellkernen von Chironomus, Chromosoma (Berl.), 21, 109-122 (1967).

+ LIBIKOVA , H., and MOTAJOVA, J., persistent infection of a human diploid cell strain with tick-borne encephalitis virus, Acta virol., 11, 380 (1967).

LIMA DE FARIA, A., NILSSON, B., CAVE, P., PUGA , A., and JAWORSKA, H., tritium labelling and cytochemistry of extra DNA in Acheta, Chromosoma (Berl.), 25, 1-20 (1968).

LINTS, F.A., and JONES, R.N., effect of heterochromatin on the relationship between nuclear DNA content and chromosome volume, Heredity, 24, 147-151 (1969).

LITHNER, F., and PONTEN, J., bovine fibroblasts in longterm tissue culture, Int.J.Cancer, 1, 579-588 (1966).

LITTAU, V.C., ALLFREY, V.G., FRENSTER, J.H., and MIRSKY, A.E., active and inactive regions of heterochromatin as revealed by electron microscope autoradiography, Proc. nat.Acad.Sci. (Wash.), 52, 93-100 (1964).

MACKAY, M., HILGARTNER, C.A., and DOUNCE, A.L., further studies of DNA-nucleoprotein gel and residual-protein of isolated cell nuclei, Exp. Cell Res., 49, 533-557 (1968).

+ MAC KINNON, E., KALNINS, V.L., STICH, H.F., and YOHN, D.S., viruses and mammalian chromosomes, 6.comparative karyoligic and immuno-fluorescent studies on syrian hamster and human amnion cells infected with adenovirus type 12, Cancer Res., 26, 612-618 (1966).

MAC MICHAEL, H., WAGNER, J.E., NOWELL, P.C., and HUNGERFORD, D.A., chromosome studies of virus-induced rabbit papillomas and derived primary carcinomas, J.nat.Cancer Inst., 31, 1197-1215 (1963).

MACPHERSON, I., characteristics of a hamster cell clone transformed by polyoma virus, J.nat.Cancer Inst., 30, 795-816 (1963).

MAIO, J., and SCHILDKRAUT, C.L., a method for the isolation of mammalian metaphase chromosomes, Meth.Cell Physiol., v. II, 113-130 (1966).

+ MAKINO, S., YAMADA, K., and KAJII, T., chromosome aberrations in leukocytes of patients with aseptic meningitis, Chromosoma (Berl.), 16, 372-380 (1965).

MALUCCI, L., and ALLISON, A.C., lysosomal enzymes in cells infected with cytopathic and non-cytopathic viruses, J.exp.Med., 121, 477-485 (1965).

MARINOZZI, V., fine structure of interphase nuclei, (an experimental study with critical review of preparatory methods, Sperimentale, 116, 381-435 (1966).

+ MARK, J., double minutes, a chromosomal aberration in ROUS sarcoma in mice, Hereditas /Lund), 57, 1-22 (1967).

-- chromosomal analysis of 91 primary Rous sarcomas in the mouse, Hereditas (Lund), 57, 23-82 (1967).

+ MARQUEZ-MONTER, H., HIGUERA-BALLESTEROS, F.J., ALFARO-KOFMAN, S., Monte MAYOR, E.G., and GONZALEZ-ANGULO, A., chromosomes in human rabies, Lancet, (1967-II), 102.

+ MASSIMO, L., VIANELLO, M.G., DAGNA-BRICARELLI, F., and TORTOROLO, G., Brit.med.J., (1965-II), 172.

+ MATSANIOTIS, N., KIOSSOGLOU, K.A., MAOUNIS, F., and ANAGOSTAKIS, D.E., chromosomes in infectious hepatitis, Lancet, (1966-II), 1421.

-- , MAOUNIS, F., KIOSSOGLOU, K.A., and ANAGNOSTAKIS, D.E., chromosomes after smallpox vaccination, Lancet, (1968-I), 978.

-- , -- , -- , and -- , chromosomes in infectious hepatitis, Delt.Paidiat.Klin. Panep.Athin., 15, 14-26 (1968).

+ MAULER, R., and HENNESSEN, W., virus-induced alterations of chromosomes, Arch.ges.Virusforsch., 16, 175-181 (1965).

MAZIA, D., and JAEGER, L., nuclease action, protease action and histochemical tests on salivary chromosomes of Drosophila melanogaster, Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.), 25, 456-461 (1939).

-- , enzyme studies on chromosomes, Cold Spr.Harb.Symp.quant. Biol., 9, 40-46 (1941).

-- , HAYASHI, T., and YUDOWITCH, K., fiber structure in chromosomes, Cold Spr.Harb.Symp.quant.Biol., 12, 122-130 (1947).

+ MAZZONE, H.M., and YERGANIAN, G., gross and chromosomal cytology of virus infected chinese hamster cells, Exp.Cell Res., 30, 591-592 (1963).

MECHELKE, F., die Entstehung der polyploiden Zellkerne des Antherentapetums bei Antirrhinum majus L., Chromosoma (Berl.), 5, 246-295 (1952).

+ MELLA, B., and LANG, D.J., leukocyte mitosis suppression in vitro with acute infectious hepatitis, Sciemce, 155, 80-81 (1967).

+ MELLMAN, W.J., PLOTKIN, S.A., MOORHEAD, P.S., and HARTNETT, E.M., rubella infections of human leukocytes, Am.J.Dis.Childh., 110, 473-476 (1965).

MESTECKY, J., and MEDLIN, J., role of lysozyme and character of antibodies in experimental viral infections, Acta virol, 11, 206-215 (1967).

+ MIKHAILOVA, G.R., actions of viruses on the karyotype of man and animal, Genetika (Leningrado), 7, 129-137 (1967).

+ MILES, C.P., and O'NEILL, F., chromosomes of eight in vitro lines of Burkitt's lymphoma, Cancer Res., abstr.7,49 (1966).

-- , and -- , prominent secondary constrictions in pseudodiploid human cell line, Cytogenetics, 5, 321-334 (1966).

-- , and -- , chromosome studies of eight in vitro lines of Burkitt's lymphoma, Cancer Res., 27, 392-402 (1967).

-- - and -- , near terminal labelling of fragmented and other chromosomes, Proc.Am.Ass.Cancer Res., 8, 46 (1967), 9 , No. 191, abstr. (1968).

-- , ARMSTRONG, D., CLARKSON, B., and KEANE, J., chromosomes of in vitro lines of human leukemia, Proc.Am.Ass.Cancer Res., 8,46 (1967).

-- , and -- , chromosome abnormalities induced in human cells by herpes virus type 2, Am.Ass.Cancer Res., 10, 58, abstr. No. 230, (1969).

-- ,and -- , chromosome changes in human cells induced by herpes simplex types 1 and 2, Nature (Lond.), 223, 851-852 (1969).

MILLARD, R.E., and SEIF, G., chromosomes in malignant lymphomas, Lancet, (1967-I), 781.

MILLER, O.L.jr., and BEATTY, B.R., visualization of nucleolar genes, Science, 955-957 (1969).

MILNER, G.R., and HAYHOE, F.G.J., ultrastructural localisation of nucleic acid synthesis in human blood cells, Nature (Lond). 218, 785-787 (1968).

MIMS, C.A., DAY, M.F., and MARSHALL, I.D., cytopathic effect of Semliki-forest virus in the mosquito Aedes aegypti, Am.J.trop.Med., 15, 775-784 (1966).

MITELMAN, F., preferential chromosome loss in a Rous rat sarcoma in response to environmental changes, Hereditas (Lund), 54, 202-212 (1965).

MOORHEAD, P.S., NOWELL, P.C., MELLMAN, W.J., BATTIPS, D.M., and HUNGERFORD, D.A., chromosome preparations ~~from human~~ of leukocytes cultured from human peripheral blood, Exp. Cell Res., 20, 613-616 (1960).

+ -- , and SAKSELA, E., the sequence of chromosome aberrations during SV 40 transformation of human diploid cell strains, Hereditas (Lund), 52, 271-284 (1965).

+ -- , and WEINSTEIN, D., cytogenetic alterations during malignant transformation, in: Recent Results in Cancer Research, ed.: KIRSTEN,W.H., Springer-Verlag (Berlin-Heidelberg-N.Y.)(1966), v. VI, p. 104-111.

MORRIS, O.N., metabolic changes in diseased insects, 1.autoradiographic studies on DNA synthesis in normal and polyhedrosis virus infected lepidoptera, J.Invert.Path. (N.Y.), 10, 28-38 (1968).

+ NACHTIGAL, M, MATACHE, A., ADERCA, I., and IF TIMOVICL, M., chronic infections with RNA viruses in cell cultures, 3.chromosomal changes in normal and chronically infected cell cultures, Rev.Roumaine inframicrobiol., 3, 43-52 (1966).

NAGL, W., karyologische Anatomie der Samenanlage von Pinus silvestris, Öst.bot.Z., 112, 359-370 (1965).

-- , mikrophotometrische DNS-Messungen an Interphase und Ruhekernen sowie Mitosen in der Samenanlage von Pinus silvestris, Pflanzenphysiol., 56, 40-56 (1967).

NAYAR, R., histopathogenic studies in Areca catechu L. infected with yellow leave disease, Phytopath.Z., 61, 34-37 (1968).

+ NEU, R.L., SCHLEGEL, R.J., LEAO, J.C., and GARDNER, L.I., chromosomes of foetus follwing maternal rubella, Lancet, (1964-II), 1185.

NEWMAN, L.jr., bridge and fragment aberrations in Podophyllum peltatum, Genetics, 53, 55-63 (1966).

+ NICHOLS, W.W., LEVAN,A., HALL, B, and ÖSTERGREN, G., measles associated chromosome breakage, Hereditas (Lund), 48, 367-370 (1962).

-- , relationships of viruses, chromosomes and carcinogenesis, Hereditas (Lund), 50, 54-79 (1963).

-- , in vitro chromosome breakage induced by arabinosyladenine in human leukocytes, Cancer Res., 24, 1502-1505 (1964).

+ NICHOLS, W.W., LEVAN, A., AULA, P., and NORRBY, E., extreme chromosome breakage induced by measles virus in different in vitro systems, HEREDITAS (Lund), 51, 370-382 (1964).

-- , -- , CORIELL, L.L., GOLDNER, A.H., and AHLström, C.G., chromosome abnormalities in vitro in human leukocytes associated with Schmidt-Ruppin strain of Rous sarcoma virus, Science, 146, 248-250 (1964).

-- , -- , and KIHLMAN, B.A., chromosome breakages associated with viruses and DNA inhibitors, Cytogenetics of Cells in Culture, Academic Press (London and N.Y.), p.255-271 (1964).

-- , and HENEEN, W.K., chromosomal effects of arabinosylcytosine in a human diploid cell strain, Hereditas (Lund), 52, 402-410 (1965).

-- , and LEVAN, A., measles associated chromosome breakage, Arch.ges.Virusforsch., 16, 1-5 (1965).

-- , -- , AULA, P., and NORRBY, E., chromosome damage associated with the measles virus in vitro, Hereditas (Lund), 54, 101-118 (1965).

-- , -- , HENEEN, W.K. and PELUSE, M., synergism of the Schmidt-Ruppin strain of the Rous sarcoma virus and cytidine-triphosphate in the induction of chromosome breaks in human cultured leukocytes, Hereditas (Lund), 54, 213-236 (1965).

-- , studies on the role of viruses in somatic mutation, Hereditas (Lund), 55, 1-27 (1966).

-- , the role of viruses in the etiology of human chromosomal abnormalities, Am.J.hum.Genet., 18, 81-92 (1966).

-- , malignant conversion by avian sarcoma virus, in: Recent Results in Cancer Research, ed. W.H.KIRSTEN, Springer-Verlag (Berlin-Heidelberg-N.Y.- Bd. VI,(1966), p.17-19.

-- , AULA, P, LEVAN, A., HENEEN, W., and NORRBY, E., radioautography with tritiated thymidine in measles and Sendai virus induced chromosome pulverisation, J. Cell Biol., 35, 257-262 (1967).

-- , LEVAN, A., and HENEEN, W.K., studies on the role of viruses on somatic mutation, Hereditas (Lund), 57, 365-368 (1967).

-- , PELUSE, M., GOODHEART, C., MAC ALLISTER, R., and BRADT, C., autoradiographic studies on nuclei and chromosomes of cultured leukocytes after infection with tritium-labeled adenovirus type 12, Virology, 34, 303-311 (1968).

+ NORRBY, E., LEVAN, A., and NICHOLS, W.W., the correlation between the chromosome pulverisation and other biological activities of measles virus preparations, Exp.Cell Res., 41,

NORRYD, C., and FJELDE, A., the chromosomes in the human cancer tissue culture line H.Ep.2, Cancer Res., 23, 197-200 (1953).

NOVIKOFF, A.B., lysosomes and related particles, in: BRACHET,J.,the cell, v.II, p. 423-488 (1961), Academic Press,N.Y.-Lond.

NUR, U., endomitosis in the mealy bug, Planococcus citri (Homoptera, Coccoidea), Chromosoma (Berl.), 24, 202-209 (1968).

+ NUSBACHER, J., HIRSCHHORN, K., and COOPER, L.Z., chromosomal abnormalities in congenital rubella, New Engl.J.Med., 276, 1409-1413 (1967).

OBE, G., chromosomal endoreduplication in normal controls, Lancet, (1965-I), 53.

ÖSTERGREN, G., and WAKONIG, T., true or apparent sub-chromatid breakage and the induction of labile states in cytological loci, Botaniska Notiser., 4, 357-375 (1954).

OHNUKI, Y., demonstration of the spiral structure of human chromosomes, Nature (Lond.), 208, 916-917 (1965).

-- structure of chromosomes, 1.morphological study of the spiral structure of human somatic chromosome, Chromosoma (Berl.), 25, 402-428 (1968).

+ OWEN, J.J.T., MOORE, M.A.S., and BIGGS, P.M., chromosome studies in Marek's disease, J.nat.Cancer Inst., 37, 199 (1966).

PALMER, C.G., the cytology of rabbit papillomas and derived carcinomas, J.nat.Cancer Inst., 23, 241-249 (1959).

+ PARNES, V.A., RAPOPORT, I.A., and LEVINA, D.M., genetic analysis of the action of Rous sarcoma virus (Schmidt-Ruppin strain) on Drosophila, Dokl.Akad.Nauk SSSR, 182, 953-956 (1968).

+ PAVAN, C., nucleic acid metabolism in polytene chromosomes and the problem of differentiation, Brookhaven Symp. Biol., 18, "genetic control of differentiation", (1965).

-- and BASILE, R., invertebrate pathology, cytology and development, J.Invert.Path.(N.Y.), 8, 131-132 (1966).

-- and -- , chromosome change induced by infections in tissues of Rhynchosciara angelae, Science, 151, 1556-1558 (1966).

-- chromosomal changes induced by infective agents, Triangle 8, 42-48 (1967).

-- and PERONDINI, A.L.P., changes in chromosomes induced by infections in cells of Sciara, Ann.Meeting, 35th Am. Genet.Soc., abstr., (1966).

-- and -- , heterozygous puffs and bands in Sciara ocellaris Comstock(1882), Exp. Cell Res., 48, 202-204 (1967).

PETRES, J., und HUNDEIKER, M., Chromosomenpulverisation nach Arseneinwirkung auf Zellkulturen in vitro, Arch.klin.exp. Derm., 231, 366-370 (1968).

+ PIRTLE, E.C., chromosomal variations in a pig kidney cell line persistently infected with hog cholera virus, Am.J.vet. Res., 27, 737-745 (1966).

+ PLOTKIN, S.A., BOUé, A., and BOUé, J.G., the in vitro growth of rubella virus in human embryo cells, Am.J.Epidemiol., 81, 71 (1965).

PONTEN, J., chromosome analysis of three virus associated chicken tumors : Rous-sarcoma, erythroleukemia and RPL 12 lymphoid tumor, J.nat.Cancer Inst., 30, 897-921 (1963).

PONTEN, J., and LITHNER, F., absence of specific chromosome alterations in bovine lung fibroblasts exposed to RSV, Int.J.Cancer, 1, 589-598 (1966).

+ PRUNIERAS, M., et JACQUEMONT, C., études sur les rapports virus-chromosomes, 4.analyse caryologique des cultures cellulaires de hamster adulte infectées ou non avec le virus SV 40, Ann.Inst.Pasteur, 109, 185-203 (1965).

-- , -- , CHARDONNET, Y., et GAZZOLO, L., études sur les rapports virus-chromosomes, 6.étude caryotypique du papillome de Shope, Ann.Inst.Pasteur, 110, 145-174 (1966).

RABSON, A.S., O'CONNOR, G.T., BARON, S., WHANG, J.J., and LEGALLAIS, F.Y., morphological, virological and cytogenetic studies in vitro of a malignant lymphoma from an african child, Int.J.Cancer, 1, 89-106 (1966).

+ RADSEL-MEDVESCEK, A., and BLATNIK, D., chromosome abnormalities in measles patients and in children given living attenuated measles virus vaccine, Zdrav.Vestn., 6, 179-181(1967).

RAGETLI, H.W.J., virus-host interactions with emphasis on certain cytopathic phenomena, Canad.J.Bot., 45, 1221-1234 (1967).

RAMEL, C., genetic effects of organic mercury compounds, 1.cytological investigations on Allium roots, Hereditas (Lund), 61, 208-230 (1969).

-- , and MAGNUSSON, J., ge netic effects of organic mercury compounds, 2.chromosome segregation in Drosophila melanogaster, Hereditas (Lund), 64, 231-254 (1969).

+ RAPOPORT, I.A., PARNES, V.A., and LEVINA, D.M., the effects of Rous virus (Bryan strain) on mutations in Drosophila and the connection between oogenesis and mutations, Dokl.Akad.Nauk SSSR, 183, 1197-1200 (1968).

RAPPAPORT, R., cell division: direct measurement of maximum tension exerted by furrows of echinoderm eggs, Science, 156,, 1241-1243 (1967).

RAZAVI, L., cytoplasmic localisation of phytohemagglutinin in peripheral white cells, Nature (Lond.), 210, 444-445 (1966).

RAUEN, H.M., Biochemisches Taschenbuch, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1956).

+ RENDA, Y., viruses and their effect on human chromosomes, Turk.J. Pediat., 10, 13-22 (1968).

REVELL, S.H., the accurate estimation of chromatid breakage and its relevance to a new interpretation of chromatid aberrations induced by ionizing radiations, Proc.Roy.Soc.B, 150, 563-589 (1959).

RIBBERT , D., die Polytänchromosomen der Borstenbildungszellen von Calliphora erythrocephala, Chromosoma (Berl.),21, 296-344 (1967).

RIEGER, R., and MICHAELIS, A., chemical induction of heat-reversible 'potential lesions' in Vicia faba chromosomes, Nature (Lond.), 206, 741-742 (1965).

+ ROBERTS, P.A., KIMBALL, R.F., and PAVAN, C., response of Rhynchosciara chromosomes to microsporadian infection, Exp.Cell Res., 47, 408-422 (1967).

ROBINSON, A., and PUCK, T.T., sex chromatin in newborns: presumptive evidence for external factors in human non-disjunction, Science, 148, 83-85 (1965).

ROSCHLAU, G., ein Beitrag zum histochemischen Verhalten der Kern-DNS in Interphase und Mitose dargestellt durch kombinierte Säure-hydrolyse und Akridinorange-fluorochromierung, Histochem., 5, 396-406 (1965).

ROTHFELS, K.H., and SIMINOVITCH, L., an air-drying technique for flattening of chromosomes in mammalian cells grown in vitro, Stain Technol., 33, 73-77 (1957).

ROTHFELS, K., SEXSMITH, E., HEIMBURGER, M., and KRAUSE, M.O., chromosome size and DNA content of species of Anemone L. and related genera (Ranunculaceae), Chromosoma (Berl.), 20, 54-74 (1966).

RYAN, W.L., and CARDIN, C., lysosomal stimulation and inhibition of growth of cells in tissue culture, Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.), 126, 112-114 (1967).

+ SABLINA, O.V., and BOCHAROV, E.F., chromosomal aberrations in the HeLa and HEp-2 tissue culture cells induced by herpes simplex virus, Genetika (Leningrado), 4, 128-134 (1968).

+ SAKSELA, E., chromosomal changes in human cells after infection with SV 40, Hereditas (Lund), 52, 250-251 (1964).

-- AULA,P., and CANTELL,K., chromosomal damage of human cells induced by Sendai virus, Ann.Med.Fenn.exp., 43, 132-136 (1965).

SALKINDER, M.C., and GEAR, J.H.S., virus chromosome interaction, Meet.South African Soc.Pathologists (1964).

SALZMAN, N.P., MOORE, D.E., and MENDELSOHN, J., isolation and characterisation of human metaphasechromosomes, Proc.nat. Acad.Sci. (Wash.), 56, 1449-1463 (1966).

SASAKI, M.S., SOFUNI, T., and MAKINO, S., cytological studies of tumours; chromosome abnormalities in malignant lymphomas of man, Cancer, 18, 1007-1013 (1965).

SAX, K., an analysis of X-ray induced chromosomal aberrations in Tradescantia, Genetics, 25, 41-68 (1940).

SCHAFFER, F.L., and SCHWERDT, C.E., purification and properties of poliovirus, Advanc.Virus Res., 6, 159-204 (1959).

SCHEIB, D., properties and role of acid hydrolases of the Müllerian ducts during sexual differentiation in the male chick embryo, in: Lysosomes, a CIBA Foundation Symposium, edts.: DE REUCK, A.V.S., and CAMERON, M., London (1963), p. 264-281.

SCHMID, E., und BAUCHINGER, M., Chromosomenaberrationen in menschlichen peripheren Lymphozyten nach Endoxan-Stoßtherapie gynäkologischer Tumoren, Dtsch.med.Wschr., 93, 1149-1151 (1968).

SCHNEDL, W., geregelte Anordnung der Chromatidenuntereinheiten in den Diplochromosomen bei der Endoreduplikation, 4, 140-152 (1967).

+ SCHULER, D., HERVEI, S., GACS, G., KIRCHNER, M., und SZATHMARY, J., Einfluß von Pockenimpfviren auf menschliche Chromosomen in vivo und in vitro, Humangenetik, 6, 55-60 (1968).

SCHWARZACHER, H.G., und SCHNEDL, W., autoradiographische Untersuchungen über die Endoreduplikation, Naturwissenschaften, 52, 23 (1965).

-- and -- , position of labelled chromatids in diplochromosomes of endoreduplicated cells after uptake of tritiated thymidine, Nature (Lond.), 209, 107-108 (1966).

-- and -- , endoreduplication in human fibroblast cultures, Cytogenetics, 4, 1-18 (1965).

+ SELZER, G., virus isolation, inclusion bodies and chromosomes in a rubella-infected human embryo, Lancet, (1963-II), 336-337.

SHAMBERGER, R.J., relationship between lysosomal enzyme activity and mammary tumor regression, Proc.Am.Ass.Cancer Res., abstr. Mm. 9, No.248 (1968).

-- relationship of physical factors to the inertness of lysosomal hydrolases towards one another, Experientia (Basel), 25, 491-492 (1969).

SHARMA, A.K., and BHATTACHARYYA, G.N., a study on the response of chromosomes to antibiotic treatment, Acta biol.Hung., 18, 67-75 (1967).

SHEIN, H.M., and ENDERS, J.F., transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures, 1.morphology and growth characteristics, Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.), 48, 1164-1172 (1962).

SHEPRO, D., BELAMARICH, F.A., and CHAO, F.C., retardation of clot reaction after incubation of platelets with colchicine and heavy water, Nature (Lond.), 221, 563-565 (1968).

SIMOES, L.C.G., and PAVAN, C., chromosome activity of salivary gland of Rhynchosciara maintained in vitro, Genetics, 54, 362 (1966).

SLIZYNSKI, B-M., DNA and genes, Nature (Lond.), 214, 112 (1967).

+ SOFUNI, T., MAKINO, S., and KOBAYASHI, H., a study of chromosomes in Friend virus induced leukemias, Proc.Japan.Acad., 43, 389-394 (1967).

SOMERS, C.E., and HSU, T.C., chromosome damage induced by hydroxylamine in mammalian cells, Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.), 48, 973-943 (1967).

SORSA, M., ultrastructure of intercalary heterochromatin in salivary chromosomes, abstr., 1st.Europ.Drosophila Res.Conf., (1969), The Haque, Netherlands.

+ SPIERS, A.S.D., and BAIKIE, K.A., cytogenetic studies in the malignant lymphomas, Lancet, (1966-I), 506-509.

SRIVASTAVA, L.M., induction of mitotic abnormalities in certain genera of tribe Vicieae by paradichlorobenzene, Cytologia (Tokyo), 31, 166-171 (1966).

STARK, C.R., and MANTEL, N., viral hepatitis and Down's syndrome, Lancet, (1966-II), 859.

-- and FRAUMENI, J.F.jr., viral hepatitis and Down's syndrome, Lancet, (1966-I), 1036-1037.

STARR, T.J., KAJIMA, M., and HOLMES, A.W., an electronmicroscopic and cytochemical study of adenovirus in colchicine-induced mikronucleated tissue culture cells, Tex.Rep. Biol.Med., 23,607-620 (1965).

+ STICH, H.F., and HSU, T.C., specifity of chromosome damage following viral infections, J.Cell Biol., 19, 67A-68A (1963).

-- and YOHN, D.S., viruses and mammalian chromosomes, 4. chromosome aberrations in adenovirus type 12 induced tumors of Syrian hamsters, J.nat.Cancer Inst., 35, 603--616 (1965).

-- HSU, T.C., and RAPP, F., viruses and mammalian chromosomes 1. localization of chromosome aberrations with herpes simplex virus, Virology, 22, 439-455 (1964).

-- VAN HOOSIER, G.L. and TRENTIN, G.J., viruses and mammalian chromosomes, 2.chromosome aberrations by human adenovirus type 12, Exp.Cell Res., 34, 400-403 (1964).

--- and YOHN, D.S., mutagenic capacity of adenoviruses for mammalian cells, Nature (Lond.), 216, 1292-1294(1967).

--- AVILA, L., and YOHN, D.S., viruses and mammalian chromosomes, 9.the capacity of UV-impaired adeno virus type 18 to induce chromosome aberrations, Exp.Cell Res., 53, 44-54 (1968).

STOLLER, A., and COLLMANN, R.D., incidence of infectious hepatitis followed by Down's syndrome nine month later, Lancet, (1965-I),1221-1223.

-- and -- , viral hepatitis and Down's syndrome, Lancet, (1966-II), 859.

+ STOLTZ, D.B., STICH, H.F., and YOHN, D.S., viruses and mammalian chromosomes, 7.the persistence of a chromosomal instability in regenerating, transplantated and cultured neoplasmas induced by human adenovirus type 12 in Syrian hamsters, Cancer Res., 27, 587-598 (1967).

SVOBODA, J., HLOZANEK, I., VESELEY, P., and DONNER,L., characterization of a malignant transformation of mammalian cells by Rous sarcoma, in: Symp.mutational Process, 'genetic variations in somatic cells', Prague (1965), 317-323.

SZANTO, T., MOTAJOVA, J., and PRUSTASOVA, S., persistent infection of heteroploid and diploid cells with plaque variants of NDV, Acta virol., 11, 363-371 (1967).

TABACHNICK, J., PERLISH, J.S., CHANG, L.F., and FREED, R.M., enzymatic changes in beta-irradiated epidermis of guinea pigs, acid and alkaline phosphatases and pyrophosphatases, Radiation Res., 32, 293-308 (1967).

+ TANZER, J., STOITCHKOV, Y., HAREL, P., and BOIRON, M., chromosomal abnormalities in measles, Lancet, (1963-II),1070-1071.

+ TANZER, J., STOITCHKOV, I., BOIRON, M., and BERNARD, J., altérations chromosomiques observées dans les cellules de rein de singe infectées in vitro par le virus de l'herpes, Ann.Inst.Pasteur, 107, 366-373 (1964).

TARNOK, I., and RÖHRSCHEIDT, E., Spektrum der Desoxyribonukleinsäure (DNS) im Bereich von 185-280 mu und seine Beeinflussung durch verschiedene Substanzen, Z.Naturforsch., 23b, 609-615 (1968).

THACORE, H., and WOLFF, D.A., isolation and characterisation of lysosome rich fractions from cultured cells, Exp.Cell.Res., 49, 266-276 (1968).

-- and -- , isolation of isolated lysosomes by poliovirus-infected cell extracts, Nature (Lond.), 218, 1063-1064 (1968).

THOMAS, M., TANZER, J., LEVY, J.-P., BOIRON, M., et BERNARD, J., trnasformation in vitro de cellules d'embryons de hamster par le virus SV 40, C.R.Acad.Sci. (Paris), Sér D., 257, 2573-2576 (1963).

TOPLIN, I., and SCHIDLOVSKY, G., partial purification and electron microscopy of virus in the EB 3 cell line derived from a Burkitt lymphoma, Science, 152, 1084-1085 (1966).

TORRIOLI, M., action mutagene d'un virus dans la leucose humaine, Acta Un.int.Cancer., 19, 401-403 (1963).

+ TOSHIMA, S., TAKAGI, N., MINOWADA, J., MOORE, G.E., and SANDBERG, A.A., electron microscopic and cytogenetic studies of cells derived from Burkitt's lymphoma, Cancer Res., 27, 753-771 (1967).

TRLIFAJOVA, J., and STRIZOVA, V., an investigation of human embryonic diploid cells, strain WI-38, for the possible presence of latent virus infection, J.Hyg.Epidem.(Prague), 10, 510-522 (1966).

TSCHERMAK-WOESS, E., and HASITSCHKA, G., Veränderungen der Kernstruktur während der Endomitose; rhytmische Kernwachstum und verschiedenes Heterochromatin, Chromosoma (Berl.), 5, 574-614 (1953).

+ TSUCHIDA, R., and RICH, M.A., chromosomal aberrations in viral leukemogenesis, 1.Friend- and Rauscher-leukemia, J.nat. Cancer Inst.,3333-49 (1964).

+ VASHKOVA, V.V., and ZHDANOV, V.M., effect of a virus on the chromosomal rearrangement and mitotic activity in human tissue culture cells, Vop.Virus., 11, 91-93 (1966).

VALENTI, C., cytogenetic analyses of abortuses following maternal rubella, Am.J.Obstet.Gyn., 91, 1141-1142 (1965).

VENUAT, A.-M., THERON, M.C., BRESSON, M.-L., and CATTAN, A., induction of chromosome anomalies in the mouse by injection of isogenic lysosomes, Rev.franc.Etud.clin.Biol., 13, 707-709 (1968).

VERWOERD, D.W., and HAUSEN, P., studies on the multiplication of a member of the Columbia SK group (ME virus) in L cells. IV. role of early proteins in virus induced metabolic changes, Virology, 21, 628-635 (1963).

VESELY, P., SVOBODA, J., and DONNER, L., line of hamster cells transformed by the Schmidt-Ruppin strain of Rous virus in vitro, Folia biol.(Praha), 12, 81-87 (1966).

VOGT, M., and DULBECCO, R., steps in the neoplastic transformation of hamster embryo cells by polyoma virus, Proc.nat.Acad. Sci. (Wash.), 49, 171-179 (1963).

VRBA, M., and DONNER, L., chromosome numbers and karyotypes of two rat tumors induced by Rous sarcoma in vitro, Neoplasm. (Bratisl.), 12, 265-283 (1965).373-380 (1964).

-- and -- , summary findings on the rat karyotype and on chromosomal characteristics of rat tumours induced by Rous sarcoma in vitro, Neoplasm.(Bratisl.), 12, 265-283 (1965).

+ WALKER, M., ARMSTRONG, G., and DAHMIAS, A., chromosomal analyses of infants with the rubella syndrome, Am.J.Dis.Childh., 111, 109-110 (1966).

+ WALLACE, R.E., susceptibility of human lymphoblasts (RPMI 7466) to viral infections in vitro, Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.), 130, 702-710 (1969).

WANG, T.Y., restoration of histone inhibited DNA-dependent RNA synthesis by acidic chromatin proteins, Exp.Cell Res., 53, 288-291 (1968).

WARBURG, O.,and CHRISTIAN, W., Isolierung und Kristallisation des Gärungsfermentes Enolase, Biochem.Z., 310, 384-421(1941).

WASILAUSKAS, V.P.jr., and BRECHER, A.S., the antiproteolytic activity in extracts of human tissue, Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.), 130, 1212-1215 (1969).

+ WAUBKE, R., ZUR HAUSEN, H., and HENLE, W., chromosomal and autoradiographic studies of cells infected with herpes simplex virus, J.Virol.(Baltimore), 2, 1047-1054 (1968).

WEBER, F., zur Polymorphie eines Chromosoms innerhalb von Populationen des Laubkäfers Carabus auronitens FABR., Experientia (Basel), 23, 257-258 (1967).

-- die intraspezifische Variabilität eines heterochromatischen Armes eines Chromosomes bei der Gattung Carabus L. (Coleoptera), Chromosoma (Berl.), 23, 288-308 (1968).

WEBER, R., behaviour and properties of acid hydrolases in regressing tails of tadpoles during spontaneous and induced metamorphosis, in: Lysosomes, a CIBA Symposium, edts: DE REUCK and CAMERON, Lond.(1963), p.282-305.

WEINSTEIN, D., and MOORHEAD, P.S., karyology of permanent human cell line W-18VA2, originated by SV 40 transformation, J.cell. comp.Physiol., 65, 85-92 (1965).

+ -- and -- , the relation of karyotypic change to loss of contact inhibition of ■ division in human diploid cells after SV 40 infection, J.cell.Physiol., 69, 367-376 (1967).

WHITFIELD, J.F., YOUDALE, T., AND PERRIS, A.D., early post-irradiation changes leading to the loss of nuclear structurein rat thymocytes, Exp.Cell Res., 48, 461-472 (1967).

WHITFIELD, J.F., and PERRIS, A.D., dissolution of the condensed chromatin structures of isolated thymocyte nuclei and and the disruption of DNP by inorganic phosphate and phosphoprotein, Exp.Cell Res., 49, 359-372 (1968).

WILLS, E.D., and WILKINSON, A.E., the effect of irradiation on subcellular particles: destruction of sulfhydryl groups, Int.J.Radiat.Biol., 13, 45-55 (1967).

WOLF, B.E., temperaturabhängige Allozyklie des X-chromosoms in den Kernen der Somazellen von Phryne cincta, Chromosoma (Berl.), 8, 396-435 (1957).

-- zur Karyologie der Eireifung und Furchung bei Cloeon dipterum L. (BENGTSSON)(Ephemeridae, Baetitidae), Biol. Zbl., 79, 153-198 (1960).

-- Kontrolle des crossing-over vom Temperatur-bedingten Allozykliegrad und vom alpha-Heterochromatin des X-chromosoms bei Phryne cincta, Chromosoma (Berl.), 13, 646-701 (1963).

-- structure and function of alpha- and betta-heterochromatin, results on Phryne cincta, Calcutta (1969).

WOLFF, D.A., and BUBEL, H.C., the disposition of lysosomal enzymes as related to specific viral cytopathic effects, Virology, 24, 502-505 (1964).

+ WOLMAN, S.R., HIRSCHHORN, K., and TODARO, G.J., early chromosomal changes ~~xx~~ in SV 40 - infected human fibroblast cultures, Cytogenetics, 3, 45-61 (1964).

+ XEROS, N., the chromosomes and virogenic stroma in the nucleopolyhedrosis of Tipula paludosa, J.Invert.Path., 8, 240-249 (1966).

+ YERGANIAN, G., SHEIN, H.M., and ENDERS, J.F., chromosomal disturbances observed in human fetal renal cells transformed in vitro by SV 40 and carried in culture, Cytogenetics, 1, 314-324 (1962).

-- transformation of chinese hamster derivates with polyoma- and SV 40-viruses, Genetics, 48, 917 (1963).

-- the chromosome, structural and functional aspects, Symp., (1965), IN VITRO Publ.of the Tissue Culture Ass., Vol.1.

-- CHO, S.S., HO, T., and NELL, M.N., euploidy and chromosome alterations in normal, malignant and tumor virus transformed cellsof the Chinese and Armenian hamsters, in: Symp.mutation.Process, "genetic variations in somatic cells", Prague (1965), 349-360.

-- relative growth and oncogenic potential of normal, malignant and virus-transformed cells of Dwarf species hamster, in: Recent Results in Cancer Research, ed. KIRSTEN, W.H., Springer-Verlag (Berlin-Heidelberg-N.Y.), Bd. VI, p.112-116. Euploid

-- the Armenian hamster in studies relating cell-virus interaction, Cancer Res., 7, abstr., p77 (1966).

+ YOSHIDA, M., MAKINO, S., and KINJO, T., notes on chromosome abnormalities in dog blood and kidney cells in vitro after infection with infectious canine hepatitis virus, Proc. Jap.Acad., 43, 662-667 (1967).

YOUHOTSKY-GORE, I., and PATHMANATHAN, K., some comparative observations on the lysosomal status of muscle from young and old mice, Exp.Geront., 3, 281-286 (1968).

ZUBAY, G., nucleohistone structure and function, in: BONNER, J, and TS'O, P. (edts.), the nucleohistone, p. 95-107, Holden-Day, San Francisco (1964).

+ ZUR HAUSEN, H., and STÖRMER, B., cytogenetische Untersuchungen an L-Zellen nach Vaccinia-Virus Infektion, Path.Microbiol. (Basel), 28, 962-973 (1965).

-- und LANZ, E., chromosomale Aberrationen bei L-Zellen nach Vaccinia-Virus Infektion, Z.med.Mikrobiol.Immunol., 152, 60-65 (1966).

-- -- , und STÖRMER, B., chromosomale Aberrationen nach latenter Infektion eines klonisierten L-Zellstammes mit Vaccinia-Viren, Z.med.Mikrobiol.Immunol., 152, 66-72 (1966).

-- induction of specific chromosomal aberrations by adenovirus type 12 in human embryonic kidney cells, J.Virol. (Baltimore), 1, 1174-1185 (1967).

-- chromosomal changes of similar nature in seven established cell lines derived from the peripheral blood of patients with leukemia, J.nat.Cancer Inst., 38, 683-696 (1967).

-- association of adenovirus type 12 DNA with host cell chromosomes, J.Virol. (Baltimore), 2, 218-223 (1968).

Lebenslauf

Am 22. November 1939 wurde ich, Hartmut Dietmar Bartsch, als Sohn des Oberregierungsrates Karl Bartsch und seiner Ehefrau Charlotte, geb. Rod, in Neumarkt/Schlesien geboren. 1943 zogen wir nach Berlin. 1945 wurde ich in Sachsendorf/Thüringen - wohin wir im Laufe des Krieges evakuiert worden waren - eingeschult. Nach weiterem Besuch der Volksschule in Berlin besuchte ich ab 1949 das Canisius-Kolleg in Berlin-Tiergarten. An dieser Schule legte ich 1958 die Reifeprüfung ab.

Nach 2 Semestern Botanik an der Freien Universität Berlin (1958/1959) wechselte ich die Fachrichtung und studierte an der Philosophisch-Theologischen Akademie in Paderborn Philosophie. Hier bestand ich 1962 das Philosophicum. Danach setzte ich mein naturwissenschaftliches Studium an der Freien Universität Berlin fort. 1965 legte ich das Vordiplom ab. Seit 1966 bin ich Doktorand.

Im Jahre 1966 heiratete ich meine Frau Elisabeth, geb. Klein. Wir haben ein Kind.

Aus dem Institut für Genetik der Freien Universität Berlin
(Dir. Prof. Dr. Lüers)
und dem
"Viruslaboratorium im Städtischen Wenkebach-Krankenhaus"
(Leiter: Priv.-Doz.Dr. Habermehl, Priv.-Doz.Dr. Diefenthal

Induktion von Chromosomenveränderungen durch Poliomyelitisvirus

von

Hartmut D. Bartsch

Teil II

Gemäß Ziffer 54 der Promotionsordnung (der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Freien Universität Berlin) ist die Zahl der Abbildungen bei der Drucklegung herabgesetzt worden.

Dissertation der Freien Universität Berlin

Berlin 1969

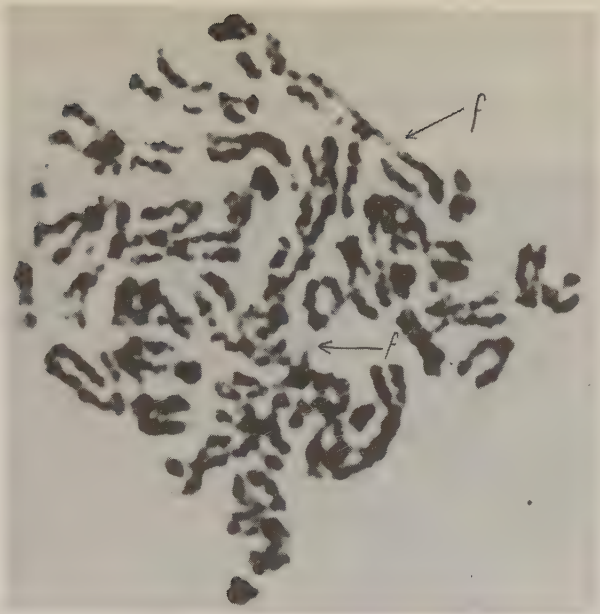
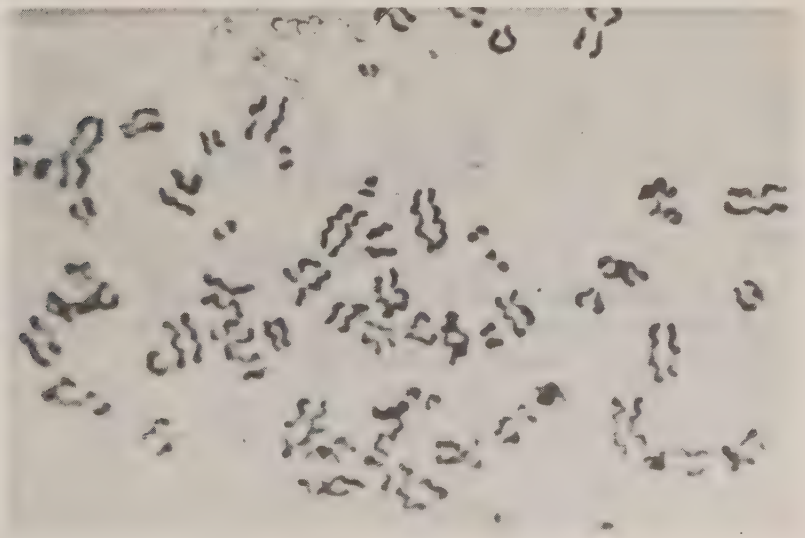


Abb. 13: Schwere diffuse Chromosomenveränderungen (6D) 6 Std. nach Infektion von WI-38-Zellen mit Poliomyelitisvirus (Färbung: Orcein-Essigsäure)(1:7800)(f = Fadenbildung)

Abb. 14: C-Anaphase-ähnliche Chromosomenmodifikationen (CA) unter den gleichen Versuchsbedingungen wie in Abb.13 (1:6100)



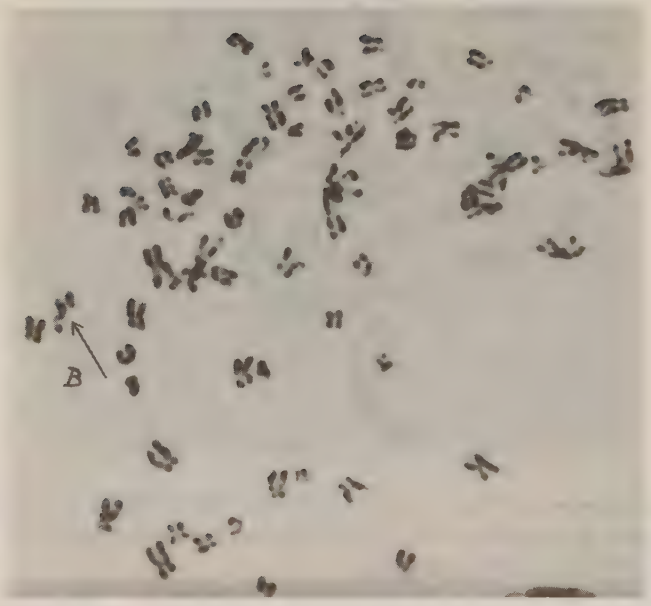


Abb. 23: Chromatidbruch (B) 6 Std. nach Infektion von HEp-2-Zellen mit Poliomyelitisvirus; einzelne Bereiche der Chromatiden sind aufgelockert (gaps) (Färbung : GIEMSA)(1:5000)

Abb. 24: Versuchsplan zur Untersuchung der Chromosomenveränderungen nach Polioinfektion in stündlichen Intervallen

Abb. 34: Versuchsplan zur Demonstration eines Colchizin-ähnlichen Effektes im Polioguanidin-System

Versuchsgruppen : K = nichtinfizierte Zellen (ohne Guanidinapplikation)
G = nichtinfizierte, guanidinbehandelte Zellen
PG = Poliomyelitisvirus-infizierte, guanidinbehandelte Zellen

Co- = ohne Colchizinapplikation. Co++ = Colchizinapplikation während der gesamten Versuchsdauer

Symbole bezüglich Inokulation vergleiche Text)

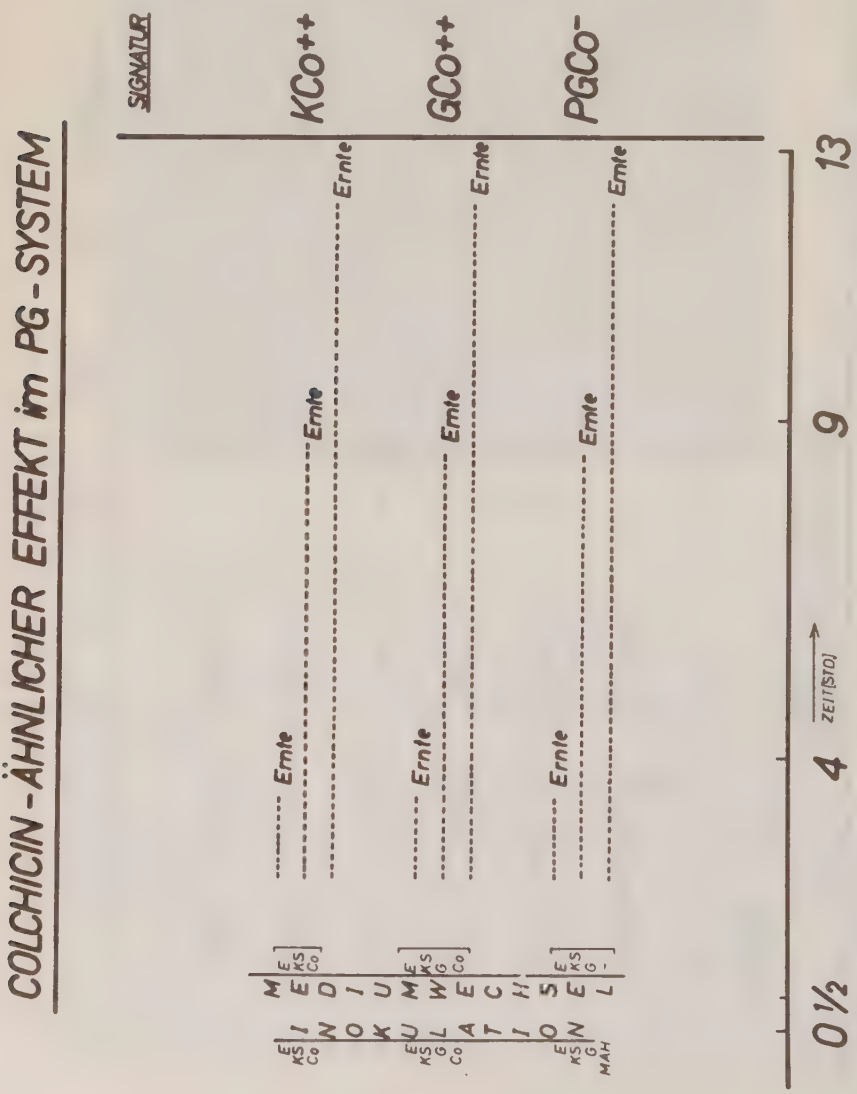


Abb. 35: Demonstration eines Colchizin-ähnlichen Effektes im Polio-Guanidin -System:

Ordinate : prozentualer Anteil Metaphasen mit AU(=Auseinanderweichen der Schwesterchromatiden in interstitiellen Bereichen), CA (=Auseinanderweichen der Schwesterchromatiden im Centromer), VK (=Verkürzung der Chromatiden)

alle anderen Symbole wie in Abb.34

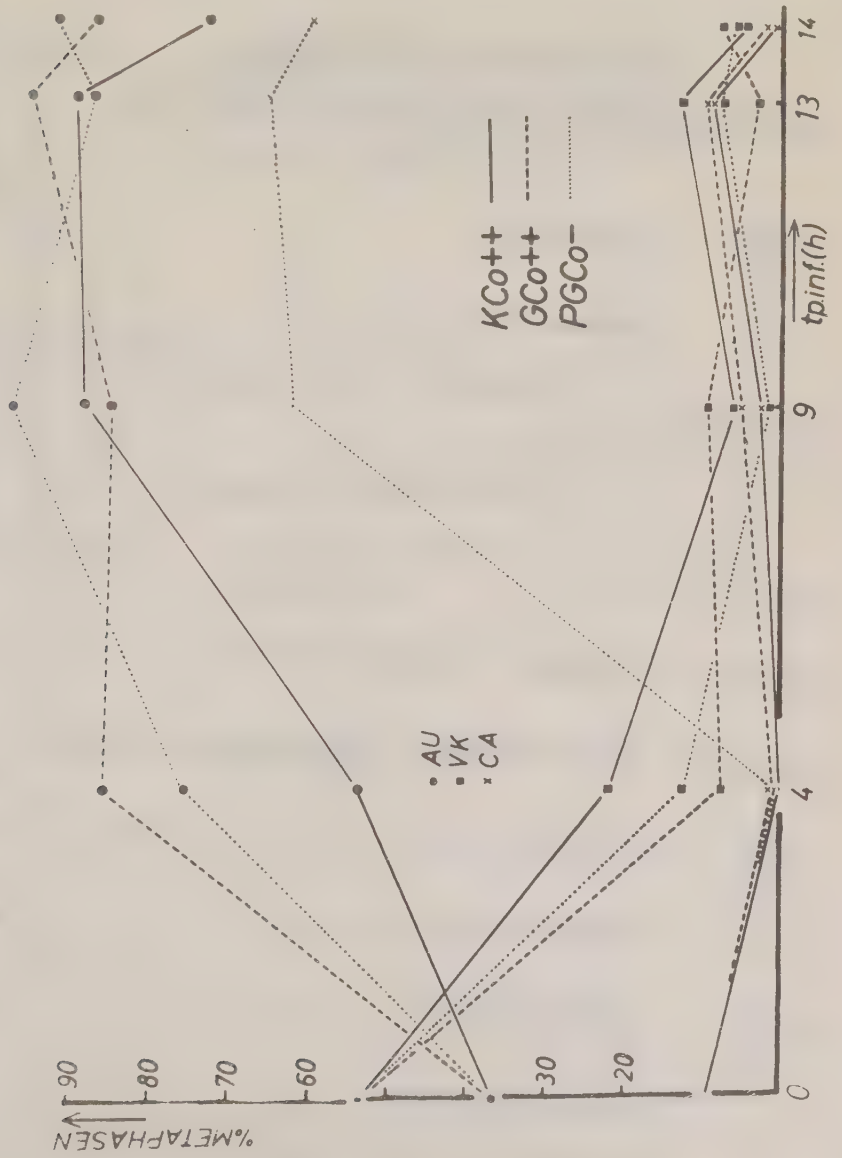
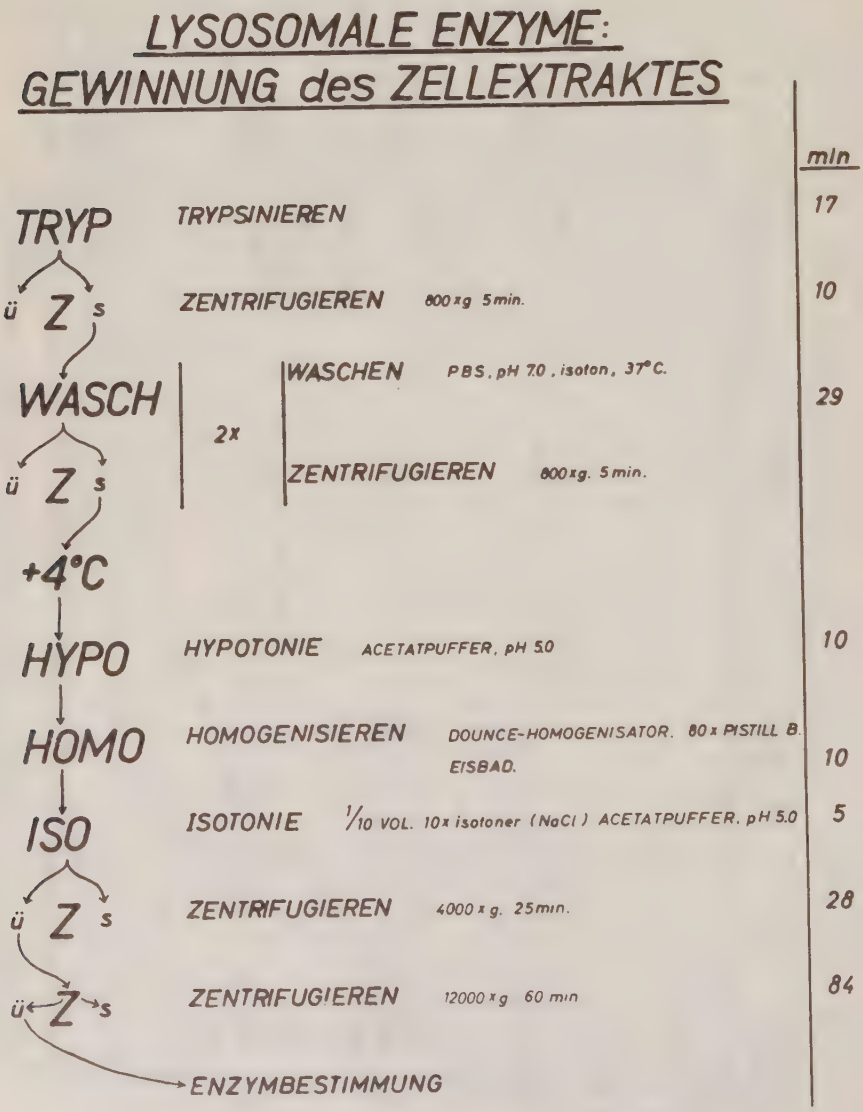


Abb. 37: Zellaufbereitung zur Erfassung von nichtpartikulären lysosomalen Enzymen



LYSOSOMALE ENZYME

BESTIMMUNG d. GESAMTAKTIVITÄT

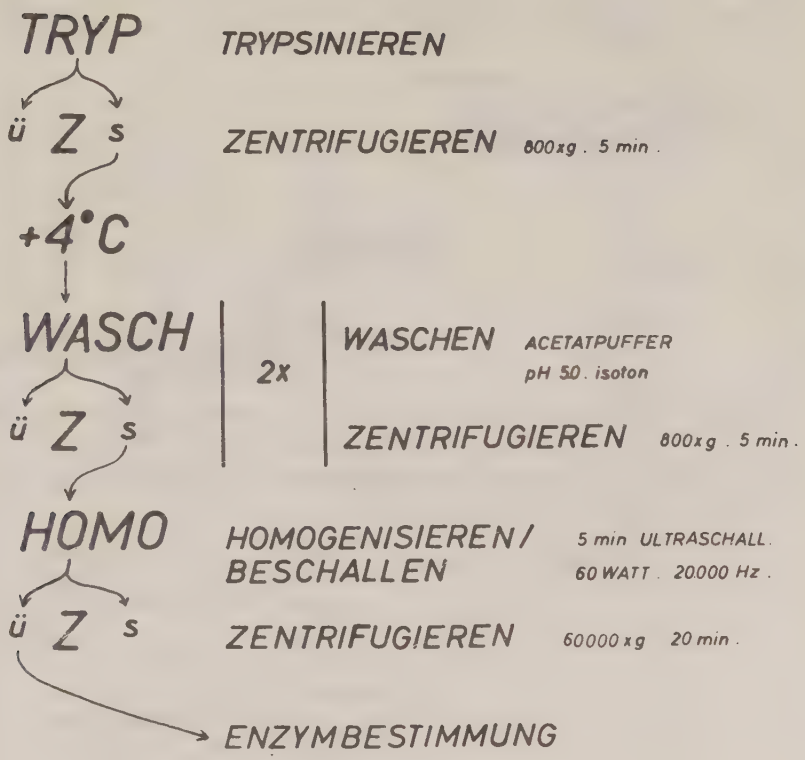


Abb. 44

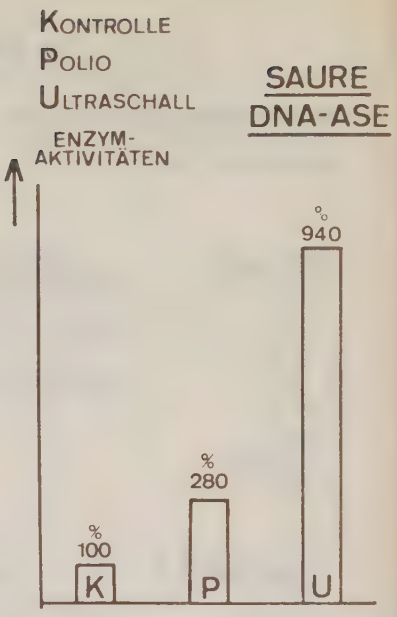
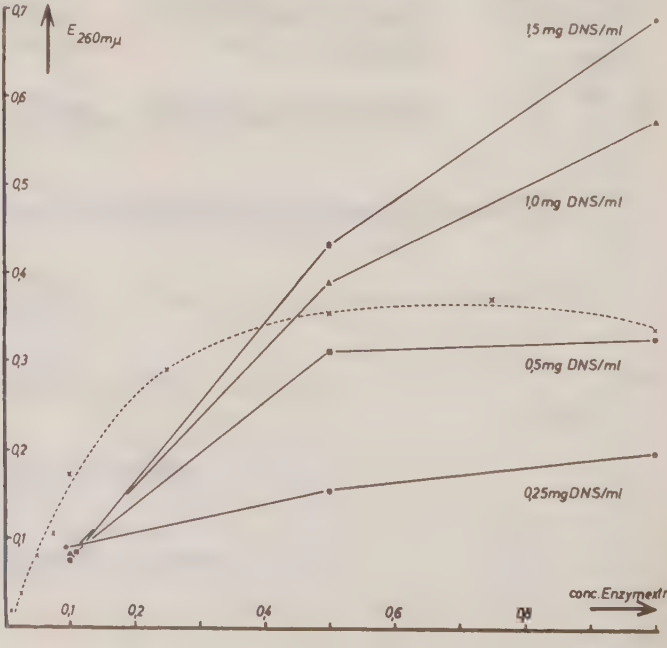


Abb. 45: Aktivität der nichtpartikulären lysosomalen DNase in Kontrollzellen (K) und 5 Std.nach Infektion von Zellen mit Poliomyelitisvirus (P); U = Gesamtaktivität der lysosomalen DNase nach Zerstörung der Lysosomen durch Ultralschall

Abb. 46: Ermittlung der geeigneten Substratkonzentration zur Bestimmung nicht-partikulärer lysosomaler DNase
Messung der DNaseaktivität bei steigender Extraktkonzentration in Abhängigkeit von der Substratmenge



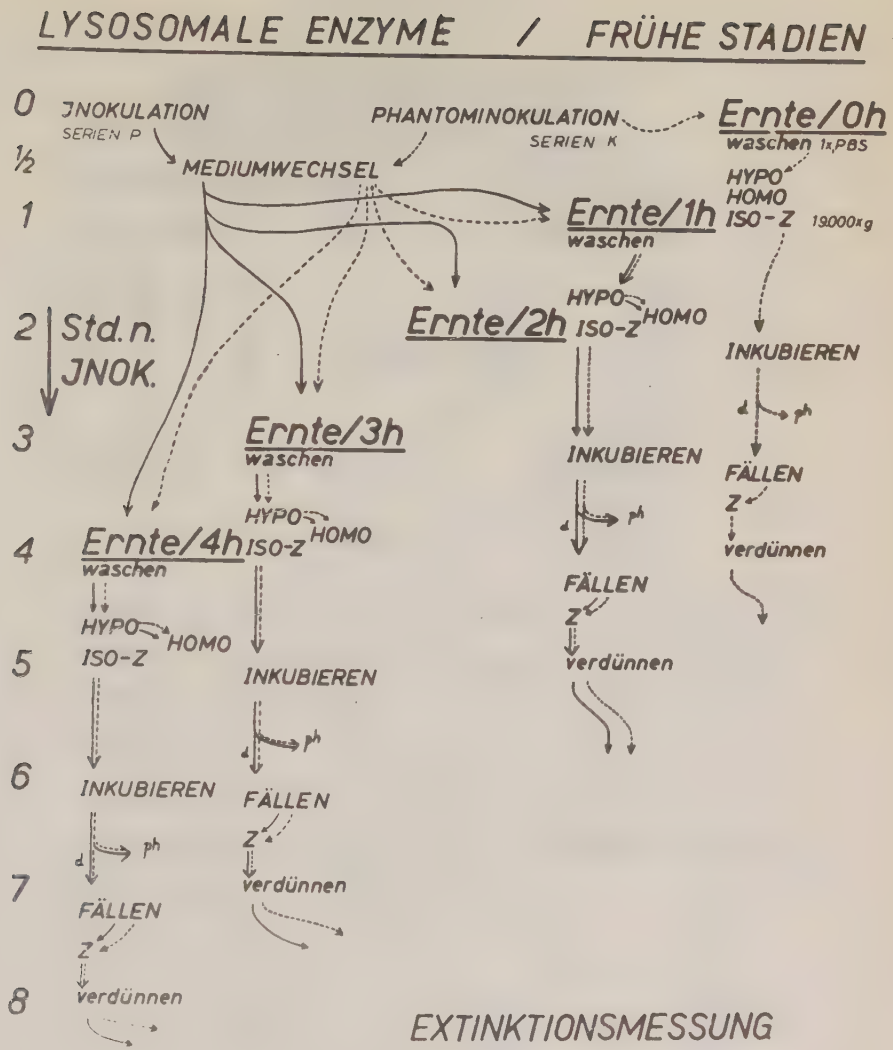

LYSOSOMALE ENZYME / FRÜHE STADIEN
0
½
1
2
3
4
5
6
7
8
Std. n. JNOK.
JNOKULATION
SERIEN P
PHANTOMINOKULATION
SERIEN K
MEDIUMWECHSEL
Ernte/0h
waschen 1x PBS
HYPO
HOMO
ISO-Z
19000xg
Ernte/1h
waschen
Ernte/2h
HYPO
ISO-Z
HOMO
Ernte/3h
waschen
Ernte/4h
waschen
INKUBIEREN
FÄLLEN
Z
verdünnen
EXTINKTIONSMESSUNG

Abb. 47

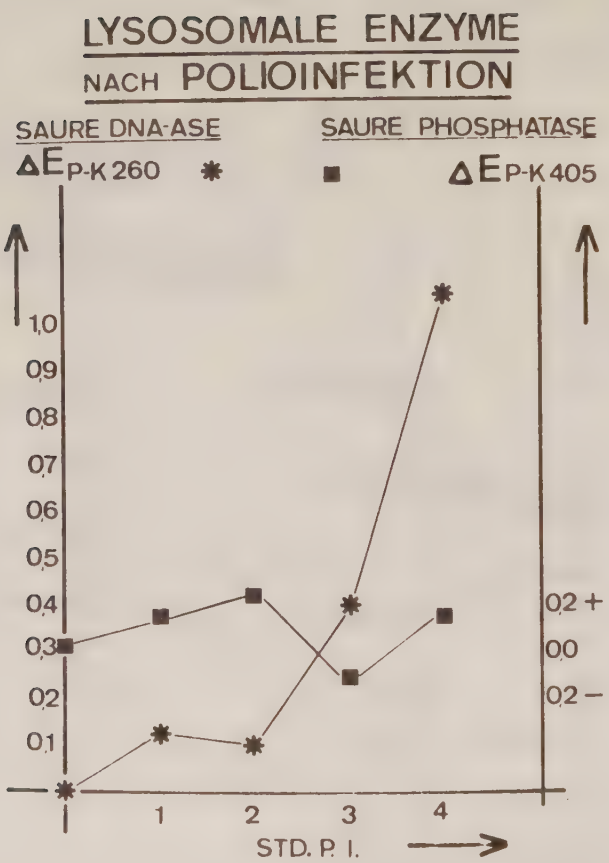

LYSOSOMALE ENZYME
NACH POLIOINFEKTION
SAURE DNA-ASE
ΔE P-K 260
SAURE PHOSPHATASE
ΔE P-K 405
1,0
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,2 +
0,0
0,2 −
1
2
3
4
STD. P. I.

Abb. 48

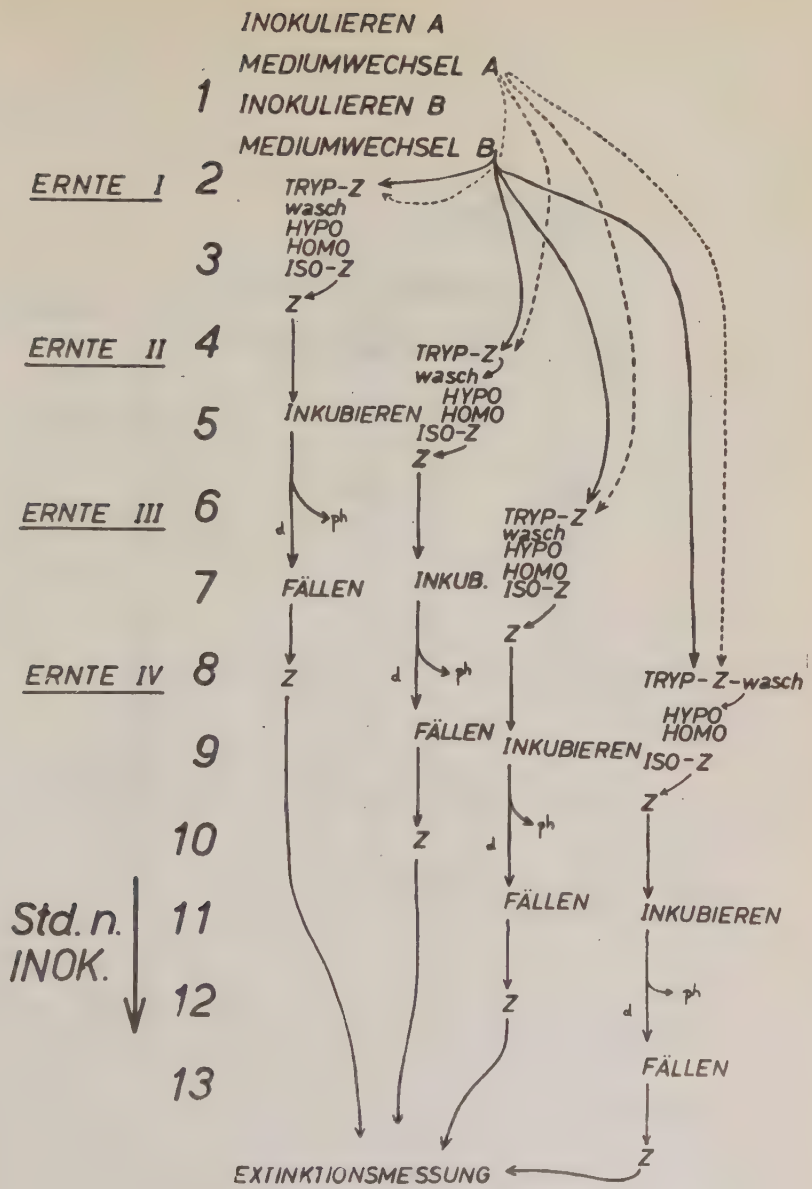


Abb. 49: Zellaufbereitung zur Erfassung der nicht-partikulären lysosomalen Enzyme in Abhängigkeit vom zeitlichen Verlauf des Poliomyelitisvirus-Reproduktionszyklus

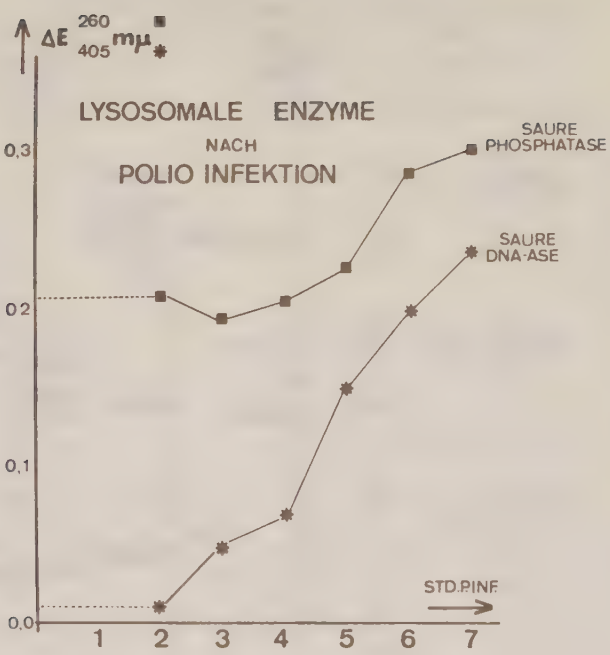

ΔE 260 mμ ■
405 ✱
LYSOSOMALE ENZYME
NACH
POLIO INFEKTION
SAURE PHOSPHATASE
SAURE DNA-ASE
0,3
0,2
0,1
0,0
STD.PINE
1 2 3 4 5 6 7

Abb. 50

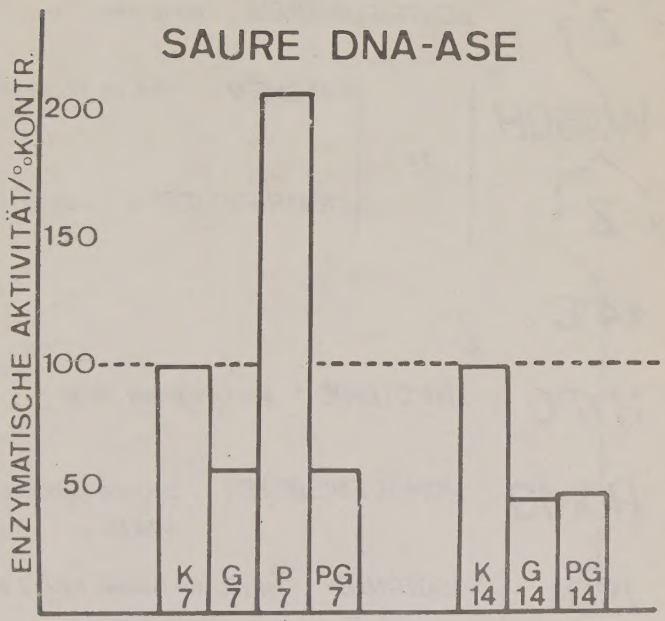
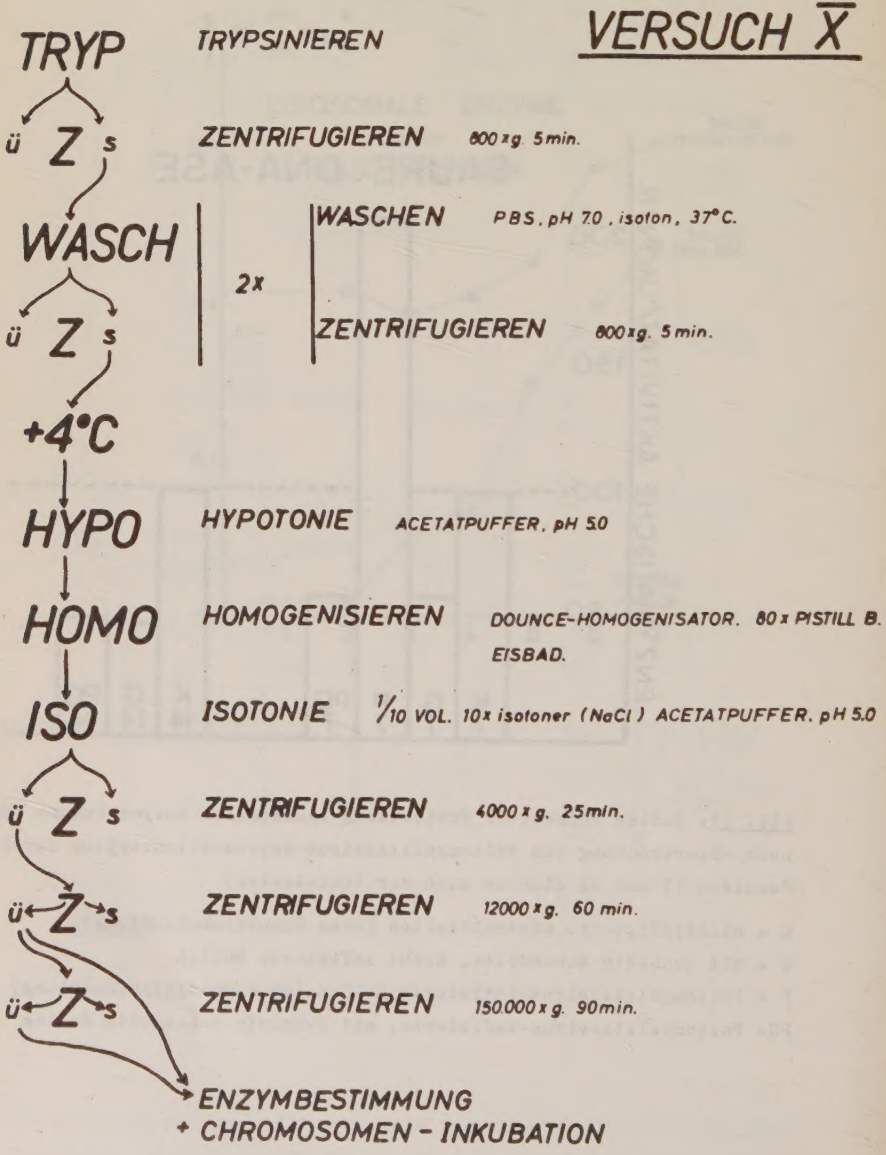


Abb. 51: Fehlen vermehrter Freisetzung lysosomaler Enzyme (saure DNase) nach Unterbrechung des Poliomyelitisvirus-Reproduktionszyklus durch Guanidin (7 und 14 Stunden nach der Inokulation)

K = nichtinfizierte Kontrollzellen (ohne Guanidinbehandlung)
G = mit Guanidin behandelte, nicht infizierte Zellen
P = Poliomyelitisvirus-infizierte Zellen (ohne Guanidinbehandlung)
PG= Poliomyelitisvirus-infizierte, mit Guanidin behandelte Zellen

Abb. 85: Zellaufbereitung zur Gewinnung nicht-partikulärer lysosomaler Enzyme nach Abtrennung der mikrosomalen Fraktion



Druck: W. Hilke KG, Berlin 30, Motzstr. 64